

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation⁴ : C12N 15/00, A61K 39/29 C12Q 1/68, G01N 33/576	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 88/ 06184 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 25. August 1988 (25.08.88)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP88/00123 (22) Internationales Anmeldedatum: 19. Februar 1988 (19.02.88) (31) Prioritätsaktenzeichen: P 37 05 512.7 P 37 44 242.2 (32) Prioritätsdaten: 20. Februar 1987 (20.02.87) 24. Dezember 1987 (24.12.87) (33) Prioritätsland: DE (71)(72) Anmelder und Erfinder: SEELIG, Renate [DE/DE]; SEELIG, Hans, Peter [DE/DE]; BURCKHARDT, Je- an [CH/DE]; Kriegsstr. 99, D-7500 Karlsruhe (DE). (74) Anwalt: DEUFEL, SCHÖN, HERTEL, LEWALD, OT- TO; Postfach 26 02 47, D-8000 München 26 (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AU, DK, FI, JP, KR, NO, SU, US. Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>
(54) Title: VIRAL ANTIGEN, PROCESS FOR ITS PRODUCTION, AND APPLICATION IN DIAGNOSIS AND THERAPY (VACCINE) (54) Bezeichnung: VIRUSANTIGEN, VERFAHREN ZU SEINER GEWINNUNG UND ANWENDUNG IN DIAG- NOSE UND THERAPIE (IMPFSTOFF) (57) Abstract A DNA of approximately 5 KB, associated with non-A,non-B hepatitis, process for the production of same accord- ing to known methods, and application of said DNA or of fragments of same in the diagnosis of non-A,non-B hepatitis, as well as in the synthesis of proteins for the generation of immunological reagents to detect non-A,non-B hepatitis or to pro- duce vaccines. The DNA and fragments of same can be cloned and also be introduced into appropriate vectors, in order to obtain viral expression products. (57) Zusammenfassung Eine Non-A,Non-B-Hepatitis assoziierte DNA von etwa 5 KB, ein Verfahren zur Herstellung derselben nach an sich bekannten Methoden und die Verwendung dieser DNA oder von Fragmenten davon zur Diagnose von Non-A,Non-B-He- patitis sowie zur Synthese von Proteinen zur Erzeugung von immunologischen Reagentien für den Nachweis von Non- A,Non-B-Hepatitis oder zur Erzeugung von Vaccinen. Die DNA und Fragmente derselben können geklont und auch in geeignete Vektoren eingesetzt werden, um Virusexpressionsprodukte zu liefern.		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	FR	Frankreich	MR	Mauritanien
AU	Australien	GA	Gabun	MW	Malawi
BB	Barbados	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BE	Belgien	HU	Ungarn	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	IT	Italien	RO	Rumänien
BJ	Benin	JP	Japan	SD	Sudan
BR	Brasilien	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SN	Senegal
CG	Kongo	LI	Liechtenstein	SU	Soviet Union
CH	Schweiz	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CM	Kamerun	LU	Luxemburg	TG	Togo
DE	Deutschland, Bundesrepublik	MC	Monaco	US	Vereinigte Staaten von Amerika
DK	Dänemark	MG	Madagaskar		
FI	Finnland	ML	Mali		

1

Virusantigen, Verfahren zu seiner Gewinnung und Anwendung
in Diagnose und Therapie (Impfstoff)

1 Non-A, Non-B-Hepatitis-erkrankungen sind in der Literatur ausführlich und zahlreich beschrieben. Ebenso bekannt sind aber die Schwierigkeiten der Erfassung des NANBH-Virus und Nachweis der Krankheit.

5

Es wurden nun aus dem Stuhl von Non-A, Non-B-Hepatitis-patienten Partikel isoliert und bezüglich ihres Molekulargewichts und ihrer Beschaffenheit charakterisiert sowie ein Nachweisverfahren auf das Vorhanden sein solcher Partikel gefunden und der Nachweis dieser Partikel zur Diagnose des Vorliegens einer Non-A, Non-B-Hepatitis bei leberkranken Patienten angewandt.

10

Aus den aus dem Stuhl isolierten Partikeln wurde DNA isoliert und nach herkömmlichen Methoden kloniert. Die so erhaltenen klonierten DNA-Stränge wurden zum Nachweis des Vorliegens homologer oder sehr ähnlicher DNA wiederum im Stuhl, Serum, Lebergewebe und Körperflüssigkeiten von leberkranken Patienten verwendet, bei denen auf diesem Wege eine Non-A, Non-B-Hepatitis mit hinreichender Wahrscheinlichkeit diagnostiziert werden kann.

15

20

Die Erfindung betrifft also zusammengefaßt die Isolierung Non-A, Non-B-Hepatitis-assoziierte Partikel, deren DNA sowie das Klonieren von DNA und die Verwendung sowohl dieser Partikel als auch der erhaltenen DNA-Klone zur Eingrenzung von Lebererkrankungen auf das Vorliegen einer Non-A, Non-B-Hepatitis. Weitere Aspekte der Erfindung liegen in der Entwicklung von erweiterten Nachweisverfahren und schließlich auch Impfstoffen auf Basis der zu erhaltenden Antikörper und durch Synthese synthetischer Peptide mit der Sequenz der Partikel, die diesen Virusproteinen entspricht und die sich aus der Sequenz der klonierten DNA vorhersagen läßt.

25

30

Aus den Stuhlproben Non-A, Non-B-Hepatitis erkrankter Patienten wurde eine Substanz isoliert, die sich signifikant ge-

35

-2-

1 häuft im Stuhl solcher Non-A- Non-B-Hepatitis-Patienten
findet, dagegen bei gesunden, sowie bei Patienten mit Leber-
erkrankungen anderer Genese in signifikant geringerem Aus-
5 maß findet. Ein Verfahren zum Nachweis dieser Substanz wur-
de entwickelt, worin Polystyrolbeads mit verdünntem Serum
von Non-A, Non-B-Hepatitis-Rekonvaleszenten beschichtet wer-
den. Die gewaschenen beads werden dann mit einer 10 %-igen
Stuhlsuspension eines zu untersuchenden Probanden inkubiert,
wobei evtl. vorhandene Non-A -Non-B-Hepatitis assoziierte
10 Substanz an die in dem Rekonvaleszentenserum enthaltenen,
an die Polystyrolkugeln gebundenen Antikörper gegen diese
Substanz bindet und so immobilisiert wird. Die Bindung der
Non-A, Non-B-Hepatitis assoziierten Teilchen kann nachgewie-
sen werden durch Bindung von menschlichem IgG wiederum aus
15 Rekonvaleszentenserum von Non-A- Non-B-Hepatitis-Patienten,
das mit Jod 125 radioaktiv markiert ist. Bei Vorliegen der
Non-A, Non-B-Hepatitis-assoziierten Substanz im Stuhl des
Probanden wird radioaktives Immunglobulin an diese gebunden
und das entsprechende Signal zum Nachweis verwendet.

20

Bei Verwendung dieses Nachweisverfahrens für die Hepatitis-
Non-A- Non-B-assoziierte Substanz in großen Kollektiven von
Patienten mit Lebererkrankungen unterschiedlicher Genese
zeigte es sich, daß diese Substanz hochsignifikant gehäuft
25 bei Patienten mit gesicherter Hepatitis Non-A, Non-B im
Stuhl nachweisbar ist (s. Tabelle 1). Bei Patienten mit an-
deren Lebererkrankungen, bei denen eine Non-A, Non-B-Hepati-
tis eher unwahrscheinlich ist, die teilweise in ihrem kli-
nischen Bild jedoch einer akuten oder abgelaufenen Non-A,
30 Non-B-Hepatitis ähneln können, insbesondere auch bei Patien-
ten mit einer akuten unabgelaufenen Hepatitis A oder B fand
sich dagegen nur in äußerst wenigen Fällen die Non-A, Non-B-
Hepatitis-assoziierte Substanz (s. Tabellen 2 und 3). Hie-
35 raus ergibt sich, daß das Vorliegen dieser Substanz einen
deutlichen Hinweis auf die Ätiologie einer zunächst unbe-

-3-

1 kannten, entzündlichen Lebererkrankung liefern kann, und daß
der Nachweis dieser Substanz daher eine Untersuchung von ho-
hen diagnostischem Wert zum Nachweis oder Ausschluß des Vor-
liegens einer Non-A, Non-B-Hepatitis liefern kann.

5

Die mit der Non-A, Non-B assoziierte Substanz weist somit
eine hohe Affinität gegenüber menschlichen Immunglobulinen
und Fibronectin sowie dessen nicht kollagenbindenden Spalt-
produkten auf. Die Bindung an Fab-2-

10 Bruchstücke aus dem IgG gesunder und Hepatitis Non-A, Non-B-
rekonvaleszenter Personen spricht gegen eine unspezifische
Bindung der assoziierten Substanz an dem Fc-Teil der Immun-
globuline. Die hohe Affinität gegenüber Fibronectin und dessen
nicht kollagenbindenden Spaltprodukten ist eine Eigenschaft,
15 die diese Substanz mit antigenen Proteinen anderer Viren ge-
meinsam hat (Seelig und Mitarbeiter 1983).

Behandlung mit organischen Lösungsmitteln (Chloroform, Äther)
und mit Hitze (70°C, 10 min.) zerstört die Bindungsaffinität
der Non-A, Non-B assoziierten Substanz nicht. Während die
20 Verdauung mit Chymotrypsin, Trypsin, Elastase und Neuraminida-
se keinen Einfluß auf die Bindungseigenschaften der Substanz
zeigt, führt die Verdauung mit Papain zu einem vollständigen
und schnellen Verlust der Bindungsaffinität.

25

Nach Zentrifugation bei 150.000 g, 2 Std.,
läßt sie sich im Sediment nachweisen und stellt sich nach
72-stündiger Laufzeit bei einer Dichte von 1,3 (1,29 - 1,32)
g/ml Cäsiumchlorid ein. Nach Auftrennung der bei 1,30 g/ml
Cäsiumchloridbandenden Fraktion über eine Gradienten-Poly-
30 acrylamidgel-Elektrophorese werden in der Silberfärbung
mehrere Bande unterschiedlichen Molekulargewichts dargestellt.
Nach Transfer auf Nitrocellulose lassen sich im Western-Blot
mit radioaktiv markierten IgG und Fab-2-Fragmenten von Non-A,
Non-B Hepatitis-Patienten und gesunden Probanden Bande dar-
35 stellen, die bei Extraktion gesunder Kontrollstühle nicht
auftreten. Insgesamt werden 4 Banden dargestellt, zwei gut

- 4 -

1 sichtbare Hauptbande mit einem geschätzten Molekulargewicht von ca.
64.000 und 56.000 sowie zwei schwächere Bande mit einem geschätzten
Molekulargewicht von 51.000 und 43.000. Die Banden mit Fab-2-
Bruchstücken sind schwächer und zeigen einen höheren Back-
5 ground. Die Auftrennung von Rohstuhlkonzentraten ohne
Cäsiumchlorid-Reinigung nach SDS-Page und Blotting zeigten
in positiven Stühlen die beiden Hauptbande mit einem unge-
fähren Molekulargewicht um 60.000.

10 Bei weiterer Analyse der Non-A, Non-B-Hepatitis-assoziierten
Partikel ließ sich DNA isolieren und mit herkömmlichen Metho-
den in Fragmenten klonieren. Diese klonierten DNA-Fragmente
aus dem Stuhl von Non-A, Non-B-Hepatitis-Patienten konnten
als DNA-Sonden für die Untersuchung des Stuhls, Serums, Leber-
15 gewebe und Körperflüssigkeiten sowie Blutkonserven und Plas-
maderivaten anderer Patienten mit Verdacht auf das Vorliegen einer
Non-A, Non-B-Hepatitis verwendet werden. Mit den klassischen Hybridisie-
rungsverfahren läßt sich so zeigen, ob in den unbekannten
Stühlen DNA vorliegt, deren Sequenz der Non-A, Non-B-Hepa-
20 titis-assoziierten DNA der erhaltenen Klone so ähnlich ist,
daß sich ein Hybridisierungssignal zeigt. Mit diesem weite-
ren Nachweisverfahren für Hepatitis Non-A, Non-B-assoziierten
DNA-Sequenzen konnten dann Proben von Probanden unter-
sucht werden auf das Vorliegen von Non-A, Non-B-Hepatitis-
25 assoziierter DNA. Die bisherigen Ergebnisse legen nahe, daß
es sich bei der Non-A, Non-B-Hepatitis-assoziierten Substanz
um ein Viruspartikel handelt und daß es sich bei der isolier-
ten DNA-Sequenz um eine Sequenz einer Virus-DNA handelt, wie
das Aufschlußverfahren einerseits und andererseits die Se-
30 quenz selbst zeigen.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung.

35

Beispiel 1

Isolierung der Non-A-Non-B-Hepatitis assoziierten Substanz
aus Patientenstuhl.

-5 -

1

Verwendeter Puffer: Tris-HCl, pH 7,4; 0,05 N in allen Arbeitsschritten

5

- a) Aufarbeitung: 0,5 g Stuhl werden in 10 ml Puffer suspendiert, bei 8.000 g zentrifugiert und der Überstand gesammelt. Der Rückstand wird noch einmal mit 10 ml und anschließend mit 5 ml Puffer ausgewaschen. Die gesammelten Überstände werden zentrifugiert (30 min., 10.000 rpm) und durch ein bakteriendichtes Filter filtriert (Millipore 0,22 µm). Der Überstand wird mit PEG 6000 (Endkonzentration 10% bzw. 0,4 mol/l) präzipitiert. Nach mindestens 2 und höchstens 12 Stunden wird das Präzipitat abzentrifugiert und in 10 ml Puffer gelöst. Diese Lösung wird mit 10 ml Freon ausgeschüttelt, die Phasen durch Zentrifugation getrennt, die Freonphase noch einmal mit 5 ml Puffer gewaschen. Die Fällung mit PEG und NaCl (Endkonzentration 10% bzw. 0,4 mol/l) wird wiederholt, das Präzipitat in ca. 800 µl Puffer aufgenommen.

10

15

Die so erhaltene Lösung wird mit RNase und DNase 1 Std. bei 37°C verdaut (800 µl PEG-Präzipitat in Tris-HCl-Puffer, pH 7,4; 0,05 M; 2.900 U RNase und 1.500 U DNase, proteasenfreie Präparationen, Boehringer). Isolierungen, die nicht zur Extraktion von DNA dienen, können ohne diesen Schritt durchgeführt werden.

20

Nach Verdauung mit DNase und RNase wird das Inkubat auf einen Cäsiumchlorid-Gradienten gebracht.

25

- b) Isolierung der Non-A, Non-B assoziierten Substanz über einen Cäsiumchlorid-Gradienten.

30

Die Zentrifugenröhrchen werden mit 1 ml Cäsiumchlorid-Lösung mit einer Dichte von 1,4 g/ml gegeben und mit je 3 ml Cäsiumchlorid von einer Dichte von 1,3 g, 1,25 g und 1,2 g/ml überschichtet. Alle Cäsiumchlorid-Lösungen werden mit dem oben genannten Puffer hergestellt, der Gradient wird mit 800 µl Stuhlextrakt überschichtet, die Zentrifugationsdauer beträgt 65 - 72 Stunden. Temperatur + 10°C, rpm 31.000. Nach Beendigung der Laufzeit wird der Gradient im unteren Bereich (Dichte 1,2 - 1,4) in Fraktionen von ca. 200 µl gesammelt, im oberen Bereich Dichte 1,1 - 1,2 können größere Fraktionen entnommen werden. Die Dichte jeder Fraktion wird durch Messung des Brechungsindex bestimmt. Alle Fraktionen werden ausgiebig gegen Puffer dialysiert und 50 µl jeder Fraktion in

35

-6-

1 NANB-Assay auf Non-A, Non-B assoziierende Substanz untersucht. Von
den positiven Fraktionen wird die Eiweißkonzentration nach Lowry be-
stimmt.

5 Verifizierung und Charakterisierung der Substanz

c) Herstellung einer Gradienten-Page

10 Zwei Lösungen mit verschiedenen Acrylamidkonzentrationen werden
durch einen Gradientenmischer zu einem linearen Gradienten aufgeschich-
tet. Die Lösung mit der höheren AA-Konzentration enthält außerdem 15
% Saccharose, um Turbulenzen zu verhindern. Ansonsten sind die Lösun-
gen zusammengesetzt wie bei LAEMMLI (1970) beschrieben. Dies gilt
auch für das Kammgel.

15 Die dialysierten und evtl. eingeeengten Fraktionen des Cäsiumchlorid-
Gradienten werden mit 10 µl SDS, 10 µl Glycerin und 5 µl beta-
Mercaptoäthanol, 5 µl Bromophenolblau pro 100 µl Probe versetzt und 3
Min. im Wasserbad gekocht. Danach werden sie mit 5 µl 0,1%igem Pyronin
20 versetzt und auf das Gel aufgetragen. Laufzeit 3 1/2 Stunden, Spannung
160 - 300 V, Stromstärke 40 - 25 A, Leistung 20 W.

Ca. 5 Min. vor Ende des Laufes wird noch einmal 5 µl Pyronin aufgetragen
und der Lauf beendet, sobald Pyronin das Kammgel durchlaufen hat.
25 Das Gel wird entweder mit Silber gefärbt (WRAY und Mitarbeiter 1981)
oder ein Western-Blotting durchgeführt (TOWBIN und Mitarbeiter 1979).
Das Blotting wird über Nacht bei 0,5 A, anschließend 1 Std. bei 1 A
durchgeführt.

30 d) Behandlung von Western-Blots

Nach Beendigung des Blotting werden die verschiedenen Streifen (an den
Pyroninmarkierungen kenntlich) ausgeschnitten und mitgeführte Moleku-
largewichtstandards mit Amido schwarz gefärbt. Probenstreifen werden
24 - 72 Stunden in 1%iger Gelatine PBS-Lösung geschüttelt. Die IgG-
35 Fraktion eines Patienten bzw. die Fab-2-Fragmente dieser IgG-Fraktion
werden mit Jod 125 (Chloramin T) markiert: 0,5 mCi auf 100 µg Protein.

-7 -

- 1 Dabei werden etwa 70 % der Aktivität inkorporiert. Der Tracer, dessen
Volumen ca. 2 ug Protein entsprechen sollte, wird in 20 ml Gelatine/PBS
verdünnt und damit die Streifen 12 Stunden unter Schütteln inkubiert.
Danach werden die Streifen je 1 Stunde 3 x mit Gelatine-PBS, 2 x mit
5 PBS-Tween 0,5 % und 1 x mit Wasser gewaschen. Nach Trocknen der
Streifen werden diese auf einen empfindlichen Röntgenfilm aufgelegt und
bei -70°C 2 - 7 Tage exponiert.

Beispiel 2

Nachweismethode für HNANB-assoziierte Substanz im Stuhl

- 10 Polystyrol Beads (Plasticball company, Chicago) wurden mit
Serum von rekonvaleszenten Patienten mit Non-A, Non-B-Hepa-
titis in einer Verdünnung von 1:200 in Carbonatpuffer, pH
9,2, 0,01 Mol/l, 12 Stunden bei Raumtemperatur
15 inkubiert. Die so beschichteten beads wurden mit
phosphatgepufferter physiologischer Kochsalzlösung (PBS)
ausgiebig gewaschen. Die Stuhlproben wurden in Form einer
10 %-igen Stuhlsuspension (g/V) 2 Stunden bei 37°C mit den
wie oben geschichteten Polystyrol Beads inkubiert, danach
20 ausgiebig mit PBS, die 0,5 % Tween 20 ent-
hielt, gewaschen und danach 1 Stunde mit humanem IgG aus
dem Serum von Rekonvaleszenten von einer Non-A, Non-B-Hepa-
titis, das mit Jod 125 markiert war, bei 37°C inkubiert.
Nach neuerlichem, ausführlichem Waschen mit destilliertem
25 Wasser wurden die an die Beads gebundene Radioaktivität in
einem Gamma-Counter ausgezählt. Stuhlproben, bei denen die
gebundene Radioaktivität den dreifachen Wert der Negativ-
kontrolle erreichte, wurden als positiv für das Vorliegen
der Non-A, Non-B-Hepatitis-assoziierten Substanz befunden.
- 30 Jede der beigefügten Tabellen 1 bis 4 wurde wie oben be-
schrieben erstellt und nach den angegebenen Kriterien aus-
gewertet. Es wurde festgestellt, daß gemäß Tabelle
1 bei Patienten einer gesicherten Non-A, Non-B-Hepatitis
diese Substanz in einem großen Prozentsatz der Fälle gefun-
35 den wurde,
daß gemäß Tabelle 2 bei Verwendung dieses Essays für diese
Non-A, Non-B-Hepatitis-assoziierte Substanz bei einem
Patientenkollektiv mit einer Vielzahl von ganz unter-

- 8 -

1 schiedlichen Lebererkrankungen, die aber nichts mit einer
Non-A, Non-B-Hepatitis zu tun haben, die Substanz, wenn
überhaupt, nur in sehr niedrigen Prozentsätzen gefunden wird.

5 Tabelle 3 zeigt, daß man während der Untersuchung von
Patientenkollektiven mit Hepatitis anderer Genese, also
entweder Hepatitis A oder Hepatitis B zu einem sehr niedri-
gen Prozentsatz die Non-A, Non-B-assoziierte Substanz fin-
det.

10

Es ist festzustellen, daß man bei den Non-A, Non-B-Hepatitis-
Fällen praktisch immer, also fast 30% positive Befunde hat,
wohingegen bei den Hepatitis A, Hepatitis A-Verdacht,
15 Hepatitis B und Posthepatitis B Patienten die Zahlen erheb-
lich niedriger liegen.

Die relative hohe positive Anzahl für die Substanz bei
chronischen Hepatitis B-Patienten läßt vermuten, daß es
20 sich um eine Doppelinfektion mit Non-A, Non-B und Hepatitis
B handelt.

25

Tabelle 4 zeigt folgendes: Eine Untersuchung an Empfängern
mit einer Bluttransfusion, die prinzipiell als Risiko-
patienten zu gelten haben, weil bei Bluttransfusionen häufig
eine Non-A, Non-B-Hepatitis Infektion eintritt. Es handelt
30 sich um eine prospektive Studie.

Hieraus ergibt sich sehr deutlich, daß abhängig vom Schwere-
grad der Folgen der Transfusion einerseits Patienten gar
35 nichts geschehen ist, wo also diese Substanzen nur in sehr
geringem Maße ausgeschieden worden ist, andererseits bei
Patienten, bei denen die Krankheit erkennbar ist und bei

- 9 -

1 denen, die eine ganz manifeste Hepatitis haben, in über
70 % der Fälle diese Substanz nachweisbar ist.

5 Beispiel 3: Isolierung von DNA aus dem Stuhl und Klonierung
von DNA-Sequenzen und deren Einbau in entsprechende Vektoren.
Einbau dieser DNA in Klonierungsvektoren.

10 Aus dem Stuhl von Patienten mit Non-A, Non-B-Hepatitis wurden, wie in Bei-
spiel 1 beschrieben, Non-A, Non-B-Hepatitis-assoziierte Partikel isoliert
und, wie dort beschrieben, mit RNAs und DNAs behandelt und über einen
Cäsiumchlorid-Gradienten gereinigt und ausgiebig dialysiert. Die dialy-
sierten Fraktionen wurden auf die oben beschriebene Art auf die Anwesen-
heit von NANB-assoziiierter Substanz untersucht. Die Fraktion
15 der Dichte von 1,3 g/ml im Cäsiumchloridgradienten wurde mit
50 Mikrogramm Proteinase K, 1 % SDS und EDTA in einer End-
konzentration von 10 mM/l 6 Stunden bei 37°C verdaut.
Proteine wurden durch Extraktion mit 80 %-igem Phenol
(Gewicht/Volumen) und Chloroform entfernt, und daraufhin
20 die in der wässrigen Phase gelöste DNA in Gegenwart von
0,3 Mol/l Natriumacetat mit einem zweieinhalb-fachen Volumen
an Äthanol für 60 Stunden bei -70°C gefällt. Danach wurde
zentrifugiert und das Sediment einmal mit 70 %-igem Äthanol
gewaschen, getrocknet und daraufhin in TE-Puffer bestehend aus 10 mmol/l
25 Tris, pH 8,0, und 1 mmol/l EDTA, in einem Volumenverhält-
nis von einem Mikroliter/5 mg aufgearbeitetem Stuhl,
aufgenommen.

30 15 Mikroliter dieser DNA-Stammlösung wurden in einem Gesamt-
reaktionsvolumen von 50 Mikroliter mit 6 Einheiten Klenow-
Polymerase (DNA-Polymerase I, großes Fragment), 1 Mikro-
liter einer Lösung von dATP, dTTP und dGTP, jeweils in
einer Konzentration von 1 mM/l, sowie 5 Mikroliter alpha-
32P-dCTP (3.000 Ci/mmol, 10 mCi/ml) im Inkubationspuffer
für Klenow-Polymerase nach den Angaben des Herstellers
35 (Boehringer, Mannheim) 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

-10-

1 Danach wurden 2,5 Mikroliter einer 1 mMol/l dCTP-Lösung zu-
gegeben und die Probe eine weitere Stunde bei Zimmertempe-
ratur inkubiert. Nach Inaktivierung des Enzyms durch Erhit-
zen auf 68°C für 10 Minuten wurde die Reaktionslösung auf
5 0°C abgekühlt. Danach wurde das Reaktionsgemisch zusammen
mit 2 Einheiten T4-DNA-Ligase, 1 Mikrogramm phosphorylierter
EcoR-I-Linker und 6 Mikroliter 10 mM ATP-Lösung für 16 Stun-
den bei 16°C inkubiert. Das Reaktionsgemisch wurde danach
auf eine Endkonzentration von 150 mMol/l NaCl eingestellt
10 und mit 240 Einheiten EcoR-I Restriktionsendonuclease (80
Einheiten/Mikroliter) 3 Stunden bei 37°C verdaut. Die Reak-
tion wurde durch Zugabe von 5 Mikroliter 80 %-igem Phenol
und 1 Mikroliter 20 %-igem SDS gestoppt. Die radioaktiv mar-
kierte und mit Linkern versehene DNA wurde von Salz und
15 nicht legierten Linkern über eine Sepharose 4B-CL-Säule
(3 ml Säulenvolumen, 25 cm Länge) abgetrennt und mit 2,5
Volumina Äthanol 16 Stunden bei -70°C gefällt. Die präzipi-
tierte DNA wurde 10 Min. bei 14.000 g zentrifugiert und das
Sediment bei 150 Mikroliter 70 %-igem Alkohol gewaschen, ge-
20 trocknet und in 10 Mikroliter TE-Puffer aufgenommen.

Beispiel 4: Einbau der isolierten DNA in lambda-Phagen und
Transfektion auf Bakterien.

25 Zur Ligation mit der Vektor-DNA wurden 2 Mikrogramm DNA des
Phagen-lambda 1149 mit 2 Einheiten EcoR-I (4 E/Mikroliter)
in einem Gesamtreaktionsvolumen von 6 Mikroliter (Inkuba-
tionspuffer nach Angabe des Enzymherstellers (Boehringer,
Mannheim) 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Dann wurde das Enzym
30 durch 10-minütiges Erhitzen auf 68°C inaktiviert. Diese Lö-
sung wurde mit 3 Mikroliter markierter DNA, die wie im vor-
gen Beispiel beschrieben, isoliert wurde, 1 Mikroliter 5 mM
ATP und 1 unit T4-DNA-Ligase bei Raumtemperatur ligiert.
4 Mikroliter dieses Reaktionsansatzes wurden in lambda-Pha-
35 genhüllen verpackt (unter Verwendung eines fertigen Verpack-
ungsextrakts der Firma Giga-Pack, Vector-cloning systems).
Mit diesen verpackten Phagen wurde der Escherichia Coli Stamm

-11-

- 1 NM 514 infiziert. Zum screening auf das Vorhandensein eingebauter DNA wurden ca. 10^5 "plaque forming units" auf 22 x 22 cm screening plates der Firma Nunc ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Phagen-DNA wurde auf Nitrozellulosefilter durch Abklatsch übertragen und die so erhaltenen Abklatschfilter wurden mit 1 Mikroliter der oben beschriebenen radioaktiven DNA Stammlösung gemäß Maniatis et al. (1982) hybridisiert, gewaschen und 6 Std. bei 70°C autoradiographiert.
- 5
- 10 Von 70 positiven Hybridisierungssignalen wurden 17 zugeordnete Phagenkolonien in einer Dichte von ca. 5 Plaques pro cm^2 ausplaziert. Nach plaques purification nach BENTON und DAVIS (1978) wurden von den schließlich erhaltenen 16
- 15 positiven Plaques Lysate hergestellt. Mehrere dieser Phagen enthielten DNA-Inserte in einer Länge zwischen 0,3 und etwa 1,5 KB, die mit einer Probe der ursprünglichen DNA-Stammlösung hybridisierten.
- 20 Beispiel 5: Charakterisierung eines DNA-Fragmentes von 0,45 KB und Subklonierung dieses Fragmentes in einem Plasmid PUC 19 in Escherichia coli.
- 25 Das DNA-Fragment wurde durch Verdauung mit entsprechenden Restriktionsendonucleasen (EcoR-I) unter den oben bereits beschriebenen Bedingungen aus dem der Phagen DNA entfernt, das Fragment dann auf Agarose Gel von der lambda-Phagen DNA getrennt und die dem Insert entsprechende DNA-Bande aus dem Gel ausgeschnitten und eluiert. Die solchermaßen isolierte Insert-DNA wird
- 30 dann genau wie oben beschrieben, in Vektor-DNA PUC 19 hineinligiert und dann auf Escherichia coli Stamm DH 1 transfiziert. Nach Selektion von Bakterienstämmen, die dieses Plasmid mit dem eingebauten Hepatitis Non-A, Non-B-DNA-Insert aufgenommen haben und vermehren wurde die Züchtung dann durchgeführt und
- 35 wie bei T. Maniatis et al. 1982, in "Molecular Cloning, a

-12-

1 laboratory manual," beschrieben, aufgearbeitet.

Das gleiche Insert wurde radioaktiv markiert

und mit Southern-Analyse auf Hybridisierung

5 mit dem DNS-Ausgangsmaterial, DNS-Extraktionen aus Stühlen von Kontrollpersonen, Hepatitis B-Virus-DNS und Escherichia coli Plasmid PBR 322 geprüft.

Beispiel 6: Nachweis von Non-A, Non-B-assoziiierter DNA im Serum

10

2 - 5 ml Serum werden bei 150.000 g 2 Stunden zentrifugiert. Das Sediment wird in 200 µl Proteinase K-Lösung (0,5 mg/ml + 10 mmol EDTA) bei 37°C 1 Stunde verdaut. Danach werden zu dieser Lösung 165 µl einer heiß gesättigten Natriumjod Lösung

15

(2,5 g Natriumjodid/ml H₂O, 75°C) gegeben (Endkonzentration 12,5 M). Diese Lösung wird 10 Minuten auf 90°C erhitzt und unmittelbar durch Nitrozellulosefilter mittels Vakuum

20 filtriert (Dot-Blot-Apparatur, Schleicher + Schüll). Nach der Filtration wird die Nitrozellulosefolie 3 x mit 70%igem Äthanol gewaschen und darauf 10 Min. bei Raumtemperatur in 100 ml Essigsäureanhydrid (100 ml 0,1 M Triäthanolamin + 250 µl Essigsäureanhydrid) inkubiert. Nach der Inkubation wird die Folie im Vakuum bei 80°C 1 - 2 Stunden gebacken. Die trockene Folie wird in Vorhybridisierungslösung

25

gebracht und 3 Stunden bei 65°C inkubiert (6 x SSC, 1 x Denhardt, 0,5 % SDS, 20 µg/ml Hitze denaturierte Heringssperma-DNS entsprechend den Angaben in: Maniatis, Molecular Cloning, 1982). Mittels Nick-Translation (siehe Maniatis, Molecular Cloning, 1982) mit 32P-markierte Probe

30

über Nacht unter Prähybridisierungsbedingungen inkubiert. Danach wird die Nitrozellulosefolie 3 x gewaschen (1) 6 x SSC, 1 x Denhardt, 0,5 % SDS, 20 µg/ml Heringssperma-DNA, 2). 1 x SSC, 0,5 % SDS, 1 x Denhardt, 3). 0,1 x SSC + 0,05 % SDS). Nach Trocknen

35

der Folie wird diese auf einen Röntgenfilm (Kodak X-Omat) aufgelegt (Autoradiographiezeit 6 Stunden bis 2 Tage bei -70°C).

-13-

- 1 Bei Seren mit hohem Gehalt an HNANB-Viren kann die Ankonzen-
trierung von 2-5 ml Serum durch Zentrifugation entfallen und die Seren nach
Proteinase-K-Verdauung entsprechend der Methode (Seelig et al.,
5 Klinikarzt 2/1985, Seite 86 ff) direkt auf Nitrozellulose
aufgetragen werden. (s. Bsp. 7)

Beispiel 7: HNANB-DNA-Nachweis im Serum

- 10 200 ul Serum werden mit 75 ul Proteinase K-Lösung (Boehringer) (4 mg/ml) und
25 ul 0,5 M EDTA bei 37°C 1 Stunde inkubiert. Das Inkubat wird mit 100 ul 1 N
NaOH 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und mit 250 ul 2 M NH₄OAc
neutralisiert. 500 ul des Ansatzes (entsprechend 181 ul Serum) werden auf
Nitrozellulose aufgetragen (Dott-Blott-Apparatur Schleicher + Schüll). Nach
15 nochmaliger Neutralisierung mit 250 ul 2 M NaH₄OAc werden die Filter in
Vakuum bei 80°C 45 Minuten getrocknet. Die Filter werden in 6 x SSC*, 0,5 %
SDS**, 1 x Denhardt-Lösung*** und 20 ul/ml Hitze denaturierter (5 Minuten,
100°C) Heringssperma-DNA bei 65°C 3 Stunden prähybridisiert. Zur Hybridi-
sierung die über Nacht unter Prähybridisierungsbedingungen erfolgt, wird das
20 durch Nick-Translation mit 32P-markierten Inserts der Phagenclone
verwendet (spezifische Aktivität ca. 1 - 2 x 10⁹ cpm/ug DNA). Die Filter
werden danach jeweils einmal 20 Minuten bei 65°C mit 6 x SSC, 1 x Denhardt-
Lösung, 0,5 % SDS, 20 ug/ml denaturierter Heringssperma-DNA, danach mit 1
x SSC, 0,5 % SDS 1 x Denhardt-Lösung und 0,1 x SSC, 0,05 % SDS gewaschen
25 und bei 80°C getrocknet. Die Autoradiographie erfolgt mittels Röntgenfilm
und Verstärkerfolie (intensiv fying screens Kodak) mit einer Autoradiographie-
zeit von 6 - 48 Stunden bei -70°C.

* 20 x SSC (Standard Saline Citrat) entspricht 3 M NaCl, 1,5 M Natrium-
citrat.

30 ** SDS Natriumdodecylsulfat

*** 100 x Denhardt-Lösung entspricht 2 % Ficoll; 2 % Polyvinylpyrrolidon, 2 %
Bovin Serumalbumin.

1 Beispiel 8

5 Dieses Beispiel zeigt eine einfachere Variante bezüglich der
Probenvorbereitung zum Dot Blot:

10 1 ml Serum wird mit 350 µl Proteinase K-Lösung (3 mg/ml
Proteinase K, 10 mM TRIS pH 7,5, 0,5 mM EDTA, 0,5 % SDS) und
125 µl 0,5 M EDTA 30 Min. bei 37°C inkubiert. Darauf wird
15 die Lösung mit 8 ml 2 M TCA (pH 7,0), 3,2 ml 2 M MNH_4Ac ,
20 µl t RNA (10 mg/ml) und 5,3 ml H_2O auf 16 ml verdünnt
und die DNA mit 10 ml Isopropanol bei Raumtemperatur für 30
Min. gefällt. Die DNA wird abzentrifugiert (15 Min. bei
8000rpm), das Pellet mit 2 ml 70 % Ethanol gewaschen und in
600 µl 10 mM TRIS pH 8,4 und 1 mM EDTA aufgenommen, einmal
mit Phenol, einmal mit Chloroform extrahiert und nochmals
gefällt. Aliquots der gefüllten DNA können für die Dot Blots
oder für Restriktionsanalysen eingesetzt werden.

20 Die Darstellung von partikelassoziiierter DNA aus Stuhlproben
erfolgt in gleicher Weise. Stuhlsuspensionen werden
allerdings vorher steril filtriert und mit PEG gefällt.

Beispiel 9

25 Wenn nur relativ wenig der N-A, N-B-assoziierten Substanz
vorliegt, hat es sich als zweckmäßig erwiesen, die DNA durch
Amplifizieren nachzuweisen:

30 Der Nachweis von Non-A, Non-B-DNA im Serum kann zweckmäßig
durch Hybridisierung mit radioaktiv markierter klonierter
Non-A, Non-B-DNA-Probe nach vorangehender spezifischer
enzymatischer DNA-Amplifizierung nach bekannter Methode
(SAIKI et al., Science 230, 1350, 1985) erfolgen.

-15-

1 25,ul Serum + 50,ul NaJ (gesättigte Lösung) mischen und
2 Min. bei 37°C inkubieren, danach 10 Minuten bei 0°C
inkubieren. Das Inkubat wird auf eine Polycarbonatmembran
(z.B. Uni Pore von Firma BioRadLab) gegen TE-Puffer (10 mmol
5 Tris; 1mmol EDTA) 20 Min. dialysiert. 5,ul des Dialysats
werden für die spezifische enzymatische DNA-Amplifikation
entnommen. Die Amplifikation erfolgt nach bekannter Methode
(SAIKI et al. 1985) mit Hilfe von je 0,5 ,ug Oligoprimern
(Paar A und B bzw. C und D). Die Oligoprimern-Paare werden
10 nach bekannten Sequenzierungsdaten mittels eines
DNA-Synthesizers (Applied BioSystem 381) hergestellt. Nach
Amplifizierung wird das Reaktionsgemisch auf einem 2%igen
Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, danach auf eine
Nylonmembran (Genofit) transferiert und mit einer nach
15 FEINBERG et al. 1983 (Annal. Biochem. 132, 6-13) mit ³²P
markierten klonierten HNANB-DNA-Probe hybridisiert. Nach
Autoradiographie werden positive Resultate anhand
mitgeführter Standards und Längenmarker identifiziert.

20 Beispiel 10

Nachweis von DNA in geprüft infektiösem Plasmaderivat:
Renger F. et al. veröffentlichten in "Deutsches
Gesundheitswesen" Vol. 36, S. 560-563 (1981) eine Studie
25 über eine kontrollierte Hepatitis Non-A, Non-B-Epidemie,
ausgelöst durch die Applikation infektiöser Antirhesusfaktor
D Immunglobulinpräparate. Die Herkunft dieser kontaminierten
Präparate konnte vollkommen aufgeklärt werden. Nach
Applikation dieses anti-D-Präparates erkrankten 79 % von 116
30 immunisierten schwangeren Frauen. Dieses anti-D-Präparat

- 1 (Charge I Ampulle A und C) sowie eine Charge mit niedriger
Infektiosität (Charge II Ampulle B und D), die durch das
selbe Säulensystem gereinigt wurde, standen zusammen mit
Kontrollpräparationen (Gammavenin, Endobolin, Rhesonativ)
5 zur Verfügung. Diese Präparationen wurden zusammen mit
Pufferkontrollen, Hepatitis B-Virus-haltigem Serum,
Positivkontrollen mit clonierten Virus-DNA-Fragmenten
eingesetzt. Der Nachweis erfolgte mittels DNA-Amplifikation
durch die Primer 237-238 (entstammen dem 0,4 Kb
10 EcoRI-Fragment).
- Ergebnisse:
In mehrfachen, unter verschiedenen Bedingungen
durchgeführten Experimenten, fand sich nach Amplifikation
ein starkes Signal in der Charge I (Ampulle A und C), ein
15 schwaches Signal bei guter Amplifikationsausbeute in der
Charge II (Ampulle B und D). Die drei Kontroll-Lyophilisate
Gammavenin, Endobolin und Rhesonativ ergaben kein Signal.
Der Zusatz von Hepatitis B-Virus-Genomspezifischen Primern
zu den verschiedenen Gammaglobulin-Präparationen ergab
20 ebenfalls keinen Hinweis auf die evtl. Kontaminierung mit
Hepatitis B-Genom. Die mitgeführten Kontrollen dienten der
Beurteilung der Effizienz der Amplifikation sowohl mit
HBV-spezifischen Primern als auch mit Non-A,
Non-B-spezifischen Primern. Der Nachweis der Identität der
25 in der infektiösen Charge befindlichen DNA mit der DNA aus
den Feces eines Patienten mit Hepatitis Non-A, Non-B
sprechen für die Identifizierung einer in Hepatitis Non-A,
Non-B-implizierten DNA.
- 30 Die Untersuchung von weiteren 57 Stuhlproben von Patienten
mit sporadischer und posttransfusioneller HNANB mittels
Radioimmunoassey wie in den vorhergehenden Beispielen
beschrieben und im Dot-Blot-Verfahren, ergab eine
signifikante Korrelation der beiden Untersuchungsverfahren
35 hinsichtlich nachweisbarer HNANB-assoziierten Substanz (RIA)
und nachweisbarer DNA (Dot-Blot, siehe Beispiel 7).

-17-

- 1 Die beigefügten Abbildungen erläutern die Erfindung:
Fig. 1 ist die Sequenz des Genoms
Fig. 2 ist eine Übersicht über die Schnittstellen mit EcoRI
sowie die offenen Leserahmen und Leseraster
5 Fig. 3 und
Fig. 4 zeigen den Plus- und Minusstrang einer ca. 0,3 Kb
Sequenz, also einer Teilsequenz des Genoms
Fig. 5 zeigt den offenen Leserahmen, und zwar die
Leseraster 1A, 2A und 3A, und
10 Fig. 6 zeigt den offenen Leserahmen für die Leseraster 1B,
2B und 3B.

Die Sequenzierung der in den Figuren beigefügten Sequenzen
erfolgte nach der Sanger-Methode nach Umklonieren von PUC 8
15 in M 13 bzw. Bluescript Vektor.

Die Charakterisierung dieser in Fig. 1 gezeigten
ursprünglich vorliegenden aus Stuhlisolaten isolierten DNA
zeigt, daß es sich um eine partiell doppelsträngige
20 zirkuläre DNA handelt.

Die DNA zeigt Verwandtschaft mit HBV-DNA. Wenn ein
kloniertes 0,45 Kb Fragment oder gereinigtes Stuhlmaterial
mit ^{32}P markiert und in einer Southern-Analyse an HBV-DNA
25 hybridisiert wurde, ergaben beide Proben ein Signal,
allerdings etwa 1000-fach geringer als mit sich selbst.
Plasmid pBR 322 und Lambda Phage ergaben kein Signal. In
Vorversuchen konnte die gereingite Stuhlprobe, ohne
denaturiert zu werden, sehr gut mit dem kleinen Fragment der
30 E.coli Polymerase markiert werden.

Mit Klenow Polymerase behandelte Stuhlprobe migrierte in
einem Agarosegel deutlich langsamer als die unbehandelte
Probe. Dies spricht dafür, daß die untersuchte DNA, ebenso
35 wie HBV-DNA, partiell doppelsträngig ist. Die Ergebnisse und
Behandlung mit Restriktionsenzymen und Primerextension
beweisen eine circuläre Struktur der DNA.

1 Die mehrfach durchgeführten Sequenzanalysen beider DNA
Stränge ergaben 4998 Basenpaare. Die Sequenz ist vom 5'- zum
3'-Ende dargestellt, die Nummerierung mit 1 beginnt im
ersten Nucleotid des 2,5 Kb EcoRI-Fragments in dem
5 DNA-Strang, der die großen offenen Leserahmen enthält (siehe
Abb. 2). Ein in der Darstellung nicht gezeigtes DNA-Fragment
von ca. 10 bis 20 Basenpaaren wurde experimentell
nachgewiesen und grenzt an die 2,5 und 1,5 Kb
EcoRI-Fragmente und bedingt also den Ringschluß der linear
10 abgebildeten DNA (vgl. Abb.2). Der Nachweis dieses Fragments
wurde durch ein Amplifikationsexperiment erbracht, wobei
gereinigte Virus-DNA mit Klenow Polymerase und den beiden
synthetischen Primern 13 und 17 inkubiert und die
DNA-Sequenz zwischen den Primern mehrfach amplifiziert und
15 nach Elektrophorese durch Southern-Analyse nachgewiesen
wurde. Da die beiden Primer an den beiden Enden der
sequenzierten DNA liegen, kann eine Amplifizierung eines
Fragmentes nur erfolgen, falls die DNA zirkulär vorliegt.
Das Virus-Genom besitzt damit eine Gesamtlänge von 5.010 bis
20 maximal 5.050 Basenpaare. Dieses Resultat wird zusätzlich
durch unabhängige Southern-Analyse des Genoms bestätigt. Die
Restriktionskarte des Genoms liegt vor. Die Reihenfolge z.B.
der einzelnen EcoRI-Fragmente ist: 1,5 / 0,45 / 0,3 / 0,15
und 2,5 Kb.

25 Bezüglich besonderer Merkmale der Sequenz ist auszuführen,
daß eine lange palindromische Sequenz (Hairpin) zwischen den
Basenpaaren 2.097 und 2.149 am Ende eines offenen
Leserahmens liegt (Pos. 4, Abb. 2).

30 An der Position 424 und 3.303 befindet sich je eine
"CTG"-Box. Bei der CTG-Box von 3.303 befinden sich auch 2
Repeats, die Sequenzhomologie mit den direkten Repeats der
Hepadnaviridae aufweisen.

35

- 1 Die offenen Leserahmen finden sich hauptsächlich nur auf
einem Strang. Der andere Strang ist wie bei Hepatitis
B-Virus-DNA bis auf kleinere Peptide geschlossen. Während
5 der offene DNA-Strang ohne weitere Modifizierung für
Proteine bis zu Molekulargewichten über 40.000 codieren
kann, sind im Komplementärstrang weite Bereiche aller drei
Leseraster geschlossen bis auf 5 Peptide von einem kleineren
Molekulargewicht von ca. 6.000 (siehe Abb. 2 und Abb. 5 und
6).
- 10 Alle überlappenden Clone ergaben für die gleiche Sequenz
identische Resultate mit einer Ausnahme, wo an der Pos.
2.381 in einem Fall G, in einem anderen Fall A gefunden
wurde. Ein Sequenzierfehler ist auszuschließen.
- 15 Das gibt einen Hinweis darauf, was durch weitere Befunde
bestätigt wird, daß Abweichungen von einigen Prozent,
insbesondere 1 bis 2 %, in der Regel keinen Einfluß auf die
Funktion der Sequenz haben, so daß funktionelle Äquivalente
20 Abweichungen bis 5 %, insbesondere bis 2 % von der
Grundstruktur haben können. Das gleiche gilt auch für die
von solchen DNAs kodierte Proteinen.
- Zusammenfassend läßt sich somit folgendes sagen:
- 25 Die Non-A, Non-B-assoziierte Substanz ist gekennzeichnet
durch die signifikante Bindung an Immunglobuline und die
Bindung an Fab2-Bruchstücke gereinigten IgGs, durch Bindung
an nicht kollagenbindende Fibronectinspaltprodukte sowie
durch die Infektiösität gegenüber menschlichen
30 Zellkulturlinien, die morphologisch darstellbar sind durch
virustypische Veränderungen derselben und molekulargenetisch
durch den Nachweis einer spezifisch hybridisierenden,
gelelektrophoretisch bei einer scheinbaren Größe von 3,2 KB
wandernden DNA (ungeschnitten und unter nativen
35 Bedingungen), innerhalb dieser Zellkulturen.

1 Die in den infizierten Zellen sowie im Serum von Non-A,
Non-B-Hepatitis-Patienten nachweisbare DNA hybridisiert mit
der aus Non-A, Non-B-Substanz isolierten, ca. 5 KB großen
DNA bzw. der aus diesem Material hergestellten klonierten
5 DNA.

Die gesamte Sequenz von ca. 5.000 Basenpaaren gemäß Fig. 1
und eine Teilsequenz von ca. 300 Basenpaaren gemäß Fig. 3
und 4 der klonierten DNA wurden bestimmt und mit bekannten
10 menschlichen DNA-Sequenzen, Phagen-DNA-Sequenzen,
Plasmid-DNA-Sequenzen und bekannten publizierten
Virus-DNA-Sequenzen verglichen. Sie entsprechen nach diesen
Daten keiner bisher beschriebenen Sequenz. Nach dem offenen
Leserahmen der Sequenz kann man Rückschlüsse auf die
15 kodierte und exprimierte virusspezifischen Proteine
ziehen. Damit kann man die hydrophilen und hydrophoben
Regionen innerhalb der Peptide identifizieren und somit ist
die Herstellung synthetischer Peptide aus den möglichen
antigenen Epitopen in den hydrophilen Regionen möglich.

20 Die gefundene DNA, insbesondere die auf dieser DNA sich
befindlichen Gene können zur Insertion in entsprechende
Expressionsvektoren, wie Zellen und Bakterien (z.B. E.coli
und Hefen, wie *Saccharomyces cerevisiae* sowie Zellkulturen),
25 und damit zur Herstellung von Virusantigenen benutzt werden.
Damit ist die Diagnostik und die Herstellung von
Immunreagentien und Vaccinen möglich. Bei der Diagnostik
sind insbesondere die Untersuchung auf Infektiosität
(Blutkonservenuntersuchung) und die Diagnose einer akuten,
30 chronischen oder zeitlich zurückliegenden Infektion zu
nennen. In Zellkulturen hergestellte Antigene sowie die
entsprechenden, durch diese Virus-DNA in vivo und in vitro
synthetisierten Proteine können zur Erstellung
immunologischer Diagnostika benutzt werden. Die DNA-Sequenz
35

1 lässt sich zur Identifizierung potentieller Virusproteine und
deren synthetischer Herstellung, also die Herstellung
synthetischer antigener Peptide, verwenden, ebenso wie sich
die DNA bzw. DNA-Teilsequenzen zur Herstellung synthetischer
5 DNA oder RNA bzw. DNA- oder RNA-Fragmente und für den
Einsatz derselben als Sonden oder Primer für die Diagnostik
einsetzen lassen. Schließlich kann man die DNA bzw. die
erstellte DNA-Sequenz zur Herstellung synthetischer Viren
(vollkommene DNA-Synthese) und zur Insertion von
10 synthetischer DNA oder DNA-Fragmente in entsprechende
Vektoren verwenden, um Virusexpressionsprodukte zu erhalten.

15

20

25

30

35

Patentansprüche

1. NANB-Hepatitis assoziierte DNA, enthaltend vor allem die DNA nach Figur 1 sowie funktionelle Äquivalente und Teilsequenzen davon.
2. NANB-Hepatitis assoziierte DNA nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie höchstens 5 %, insbesondere höchstens 2 % Abweichung von der Struktur und/oder der Kettenlänge der DNA nach Fig. 1 zeigt.

- 1
3. NANB-Hepatitis assoziierte DNA nach Anspruch 1 oder
2, dadurch gekennzeichnet, daß sie partiell doppel-
strängig zirkulär und aus einem NANB-Hepatitis
5 assoziierten Partikel bzw. aus Virus isoliert ist.
4. DNA-Teilsequenz nach Anspruch 1 -3, dadurch
gekennzeichnet, daß sie Fig. 3 bzw. 4 mit maximal
5 %, vorzugsweise maximal 2 %, Abweichung entspricht.
- 10
5. Proteine, dadurch gekennzeichnet, daß sie durch eine
DNA nach Anspruch 1 bis 4 kodiert sind oder derart
kodierten Proteinen entsprechen.
- 15
6. Proteine nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß
sie den Sequenzen der offenen Leserahmen gemäß
Fig. 5 und 6 entsprechen.
- 20
7. Verfahren zur Herstellung der NANB-assozierten DNAs
nach Anspruch 1 -4 (sowie der Proteine nach Anspruch
5 und 6) aus Stuhl, Gewebe, Körperflüssigkeiten
oder Viruskulturen, dadurch gekennzeichnet, daß
das Ausgangsmaterial, ggfs. nach vorheriger
25 Sterilfiltration und Fällung mit PEG bei Stuhl-
suspensionen, mit DNase und ggfs. RNase zur Verdauung
inkubiert wird, dann ein Dichtegradient, insbesondere
CsCl, $d = 1,3$, angelegt wird, worauf Dialyse,
Verdauung mit Proteinase K, Phenolextraktion, Äthanol-
fällung und ggfs. Extraktion und erneute Fällung
30 und Isolierung sowie ggfs. Klonen und ggfs.
exprimieren in entsprechenden Vektoren erfolgen.
- 35
8. Verwendung der DNAs nach Anspruch 1 bis 4 als
DNA-Sonden zur Diagnose, insbesondere nach klassischen
Hybridisierungsverfahren, oder zur Expression in
geeigneten Vektoren.

24.

1

9. Verwendung der DNAs nach Anspruch 1 bis 4 zur Synthese von Proteinen zur Erzeugung immunologischer Reagentien für den Nachweis von NANB-Hepatitis und zur Erzeugung von Impfstoffen.

5

10

10. Verwendung der DNAs nach Anspruch 1 bis 4 oder der auf diesen DNAs befindlichen Gene bzw. der entsprechenden DNA-Sequenzen zur Herstellung synthetischer Viren und zur Insertion der natürlichen oder synthetischen DNAs oder DNA-Fragmente in entsprechende Vektoren zur Bildung von Virusexpressionsprodukten und zur Herstellung von Virusantigenen.

15

20

25

30

35

113

1 FILE: TONGA.DNA SEQUENCE: 4998BP; 996 A; 1130C; 1087 G; 1

*** SEQUENCE LIST ***

(DOUBLE)

5 5' GAATTCCTGCC TCTTCTGTG ATTCTGATGT TGCCCTCCGGT GCTTCTGGTC TTCTTGGCCG
3' CTTAAGACGG AGAAGACAAC TAAGACTACA ACGGAGGCCA CGAAGACCAG AAGAACCGCC
70 80 90 100 110 120
TCCTTTCCAG AATTTAGGCA CGTTTCTTTT CTCTGTTTCT CTCCCTTGCT TTGGCGCTGT
AGAAAAGGTC TTAAATCCGT GCAAAGAAA GAGACAAAGA GAGGAAACGA AACCGCGACA
130 140 150 160 170 180
TGTTCTTGA ATGCTTATTA GAAAGGCGGT TGACGGATGA CTTTCTTGA TTCTTCAAA
10 ACAAGAAGCT TACGAATAAT CTTTCGCCA ACTGCCCTACT GAAAAGAACT AAAGAAGTTT
190 200 210 220 230 240
TCAGTTTTTA ACCTTTTCGG TTCGTGGTGGC GCTCTCGTCA TTGCGGTTGT TGTTTTTCTT
AGTCAAAAAT TGGAAAAGCC AAGACCACCG CGAGAGCAGT AACGGCAACA ACAAAAAGAA
250 260 270 280 290 300
GTGGCCCTCG GTATTTATAA GTTCGTAAAG GATTGGTTGC CATGGTAGAC TTTGTTTCCG
CAGCCGGAGC CATAAATATT CAAGCATTTC CTAACCAACG GTACCATCTG AAACAAAGGC
310 320 330 340 350 360
15 CTCTTGGCGT TTTTACCTCG TTTATCGCCA ATGTGCTTTC TATTTCCCTT TTTGGCTTTG
GAGAACCGCA AAAATGGAGC AAATAGCGGT TACACGAAAG ATAAAGGAAA AAACCGAAAC
370 380 390 400 410 420
GTACTTTTGG CAACTTTATT TTGGTTTGTC TTTTGCCTTC GCTTGTGTCG TTTGTTCTCT
CATGAAAACC GTTGAAATAA AACCAAACAG AAAACGAAAG CGAACAACCG AAACAAGAGA
430 440 450 460 470 480
GTGGCCCTTG GGATGGAGGT GATAAATAGT GGAAATCCCT ATTATTATCA ATACTTGGGT
20 CACCGGAAAC CCTACCTCCA CTATTATCA CCTTTAGGGA TAATAATAGT TATGAACCCA
490 500 510 520 530 540
TGATGCTGAC GCGGTTACCG TCTATACAGT GCAGTATAAA GATGGTAGCA CTTGCGATAT
ACTACGACTG CCGCAATGGC AGATATGTCA CGTCATATTT CTACCATCTG GAACGCTATA
550 560 570 580 590 600
GACCGTCCAG CAGTATGATT ATCTCAAGGC ATCCGCGCAG GCTGTGCGCG ATATGGACTC
CTGGCAGGTC GTCATACTAA TAGAGTTCCG TAGGCGCGTC CGACAGCGGC TATACCTGAG
610 620 630 640 650 660
25 TAAAGCCGCT GCTGATTCTC CTTCCGAAGC TGCTCCTGCT CCCGAGGAAC CTGCACAGAA
ATTTCCGGCA CGACTAAGAG GAAGCCTTCG ACGAGGACGA GGGCTCCTTG GACGTGTCTT
670 680 690 700 710 720
TATTATTGAA TCTCCTGACC TCCGCGAAGG TTATGTGCCG CAGGAAGAAG AATTACCTTT
ATAATAACTT AGAGGACTGG AGGCGCTTCC AATACACGGC GTCCCTCTTC TTAATGGAAA
730 740 750 760 770 780
TGAGGGGAGT TTAACCGCTT ATGATGACCG CGCAGCAGAT ACTCCGGCTT TGTATGCTAA
30 ACTCCCTCA AATTGGCGAA TACTACTGGC GCGTCGTCTA TGAGGCCGAA ACATACGATT
790 800 810 820 830 840
TCTCCCTAAC GTCTCTAATA GTTCACTAC TATTATGGAT TGGTTCGGAG ATACGTTTTT
AGAGGGATTG CAGAGATTAT CAAAGTGATG ATAATACCTA ACCAAGCCTC TATGCAAAAA
850 860 870 880 890 900
TATCGAACGT ACTGAGACGG TGCACAAGTC CGGCTATACG TCTGAAAGGT ATTCTATATA
ATAGCTTGCA TGACTCTGCC ACGTGTTCAG GCCGATATGC AGACTTTCCA TAAGGATATT
910 920 930 940 950 960
35 CAGCTCGACT CAACTTATTC AGCTTCCTTA TGCGGAGGAT TCCACTACTA CGTCTCAGGT
GTCGAGCTGA GTTGAATAAG TCGAAGGAAT ACCCTCCTA AGGTGATGAT GCAGAGTCCA

ERSATZBLATT

2/13

1	970	980	990	1000	1010	1020
	TCTCAATCCG	CAAGCTTGCG	TTTCTGCTTT	GCTTGTTGTC	CTTGCTCTCG	TTACTACTGT
	AGAGTTAGGC	GTTCGAACGC	AAAGACGAAA	CGAACAACAG	GAACAGAAGC	AATGATGACA
	1030	1040	1050	1060	1070	1080
	TACTTGGAAT	AAAAACGCGA	TTTGGGGGCG	CATGAGTTAA	TGGAAATTCT	ACCTTTACAG
	ATGAACCTAA	TTTTTGCGCT	AAACCCCGCG	GTACTCAATT	ACCTTTAAGA	TGGAAATGTC
5	1090	1100	1110	1120	1130	1140
	TATTGTTTCG	GTATCTTCTC	TGTCCCGGAA	ATTGGCTATT	TCATTGTCTT	CGCTGCTGTT
	ATAACAAAGC	CATAGAAGAG	ACAGGGGCTT	TAACCGATAA	AGTAACAGAA	GCGACGACAA
	1150	1160	1170	1180	1190	1200
	TTCTCTTTGT	TGGTCTCTCT	GCTCCGTCGG	TGACAGGTGC	CATAAATATT	ATTATGAAAG
	AAGAGAAACA	ACCAGGAGGA	CGAGGCAGGC	ACTGTCCACG	GTATTTATAA	TAATACTTTC
	1210	1220	1230	1240	1250	1260
10	GATGATGACT	TCAGGGCGCT	ACTTCTTCTA	TTCTCGCTAC	GCTGCTTTCC	TTGGTCCGTG
	CTACTACTGA	AGTCCCGCGA	TGAAGAAGAT	AAGAGCGATG	CGACGAAAGG	AACCAGCCAC
	1270	1280	1290	1300	1310	1320
	AGTTCCTTAC	CTCGATGATT	ACTTGGATGG	GTCAGCTCAT	TGATTTCTAT	GAGTCTCAGC
	TCAAGAAATG	GAGCTACTAA	TGAACCTACC	CAGTCGAGTA	ACTAAAGATA	CTCAGAGTCG
	1330	1340	1350	1360	1370	1380
	CCATTCTCCT	TGCTCTCGTG	ATTCTCACTA	TCGCGGGCAT	TGTTCTCCGT	ATCCCTCCGC
	GGTAAGAGGA	ACAGAAGCAC	TAAGAGTGAT	AGCGCCCGTA	ACAAGAGGCA	TAGGAAGCGG
15	1390	1400	1410	1420	1430	1440
	GCTGGATTCC	TGGTCGCTCC	TAACGACIGA	GAGAAAACGC	CGCCGACCAT	TTTAATGGTC
	CGACCTAAGG	ACCAGCGGCG	ATTGCTGACT	CTCTTTTGCG	GCGGCTGGTA	AAATTACCAG
	1450	1460	1470	1480	1490	1500
	GGCGACGTTT	TCTTATTTAG	AAAGGATTAT	TTGTTATGCT	TTATGGTATT	CTTATCTTTT
	CCGCTGCAAA	AGAATAAATC	TTTCCTAATA	AACAATACGA	AATACCATAA	GAATAGAAAA
	1510	1520	1530	1540	1550	1560
20	GCGTTTGCTG	GCTTTTGTGT	TATATCGATA	ACTATTGCAA	AAATCCCTAC	AAGCTCGAAG
	CGCAAACGAC	CGAAAAACAA	ATATAGCTAT	TGATAACGTT	TTTAGGGATG	TTGAGCTTC
	1570	1580	1590	1600	1610	1620
	CTGTTGTGG	TTCTAAAGGT	TCTGGCAAGT	CTCIGTATAT	GTCTCGCGTT	GCTGATAAGT
	GACAACAACC	AAGATTTCCT	AGACCGTTCA	GAGACATATA	CAGAGCGCAA	CGACTATTCA
	1630	1640	1650	1660	1670	1680
	GGCTTCGTTT	TAGTAAGGGG	TTTATTTATA	GCAATATGGG	TATTGGTTAT	GATTTAGAGC
	CCGAAGCAAG	ATCATTCCCC	AAATAAATAT	CGTTATACCC	ATAACCAATA	CTAAATCTCG
25	1690	1700	1710	1720	1730	1740
	CGGAATATTG	GAAACAGACC	TTTGCCCTTG	ATTCCCTTAT	TCTTATTGAT	GAGATAGGCG
	GCCTTATAAC	CTTTGTCTGG	AAACGGGGAC	TAAGGGAATA	AGAATAACTA	CTCTATCCGC
	1750	1760	1770	1780	1790	1800
	TGCTCCACTC	TAACCGTGAT	TTTAAGGCTA	TGCCCCGIGA	AGCTGTGCGAG	TTTTTCAAGA
	ACGAGGTGAG	ATTGGCACTA	AAATTCCGAT	ACGGGGCACT	TCGACAGCTC	AAAAAGTTCT
	1810	1820	1830	1840	1850	1860
30	TGCAGCGCAA	ATATCACTTG	ACAATAGTTG	TATCGTCTCA	GACCATGGAC	TTTGATAAAA
	ACGTCCGCTT	TATAGTGAAC	TGTTATCAAC	ATAGCAGAGT	CTGGTACCTG	AAACTATTTT
	1870	1880	1890	1900	1910	1920
	AGATTGCTGA	CTCTGTGAT	CGCATTATAT	TCTGCAATCG	TATTGGCTGG	TTTTGTCCGC
	TCTAAGCACT	GGAGACACTA	GCGTAAATAG	AGACGTTAGC	ATAACCGACC	AAAACAGCGG
	1930	1940	1950	1960	1970	1980
	TCACCCCTTA	TGGCTCCTGT	ATCGCTATGG	AACACCGTCC	CGAGGGCGGC	CAAGAGCTTG
	AGTGGGGAT	AGCGAGGACA	TAGCGATACC	TTGTGGCAGG	GCTCCCGCCG	GTTCTCGAAC
35	1990	2000	2010	2020	2030	2040
	TTAACACGGT	GCGCAAGGCG	GGCAGGGCTA	AGTGGTATAC	TATCCCCAAG	TCTGTGAAGC
	AATTGTGCCA	CGCGTTCCCC	CCGTCCCGAT	TCACCATATG	ATAGGGGTTC	AGACACTTCG

3/13

1	2050	2060	2070	2080	2090	2100
	AGGTGAGTGC	CTTAGAATAT	GATACAGAGC	AGGTTATCAG	CAAGACCCCC	TCGAAGTAAA
	TCCAATCAGC	GAATCTTATA	CTATGTCCTG	TCCAATAGTC	GTTCTGGGGG	AGCTTCATTT
	2110	2120	2130	2140	2150	2160
	AAAAAAAAC	TCCCGGTGCC	CCCGTAGGGG	GTTAGGGGAG	TTTTTTTTTT	TTTTTTTTTT
	TTTTTTTTTG	AGGGGCACGG	GGGCATCCCC	CAATCCCCCTC	AAAAAAAAC	AAAAAAAAC
5	2170	2180	2190	2200	2210	2220
	TACTGGAGCA	CTCCCGCGGT	CTTGTCACGC	GATAGCGTCT	CCACCGCGTC	CCCGGTCCCC
	ATGACCTCGT	GAGGGCGGCA	GAACAGTGCG	CTATCGCAGA	GGTGGCGCAG	GGGGCAGGGG
	2230	2240	2250	2260	2270	2280
	GCGAGGGCAA	AGCCCTCGCC	CTTCCCAAAC	AGACCGGTAG	GGGCTTCCGA	TACGTACTGA
	CGCTCCCGTT	TGGGGAGCGG	GAAGGGTTTG	TCGGGCCATC	CCCGAAGGCT	ATGCATGACT
	2290	2300	2310	2320	2330	2340
10	CTGCCGTGAC	GATGGGAACG	TGGGCGTGCG	TGTAATACGC	CCACGAAATT	TAAATTTTCT
	GACGGCACTG	CTACCCCTGC	ACCCGCAACG	ACATTATGCG	GGTGCCTTAA	ATTAAAGGA
	2350	2360	2370	2380	2390	2400
	CTTGACAACT	CATTCATACT	GTGGTAATAT	TTAGCCATGG	AAATGAAAGG	TGGTTTTCTC
	GAACGTGTGA	GTAAGTATGA	CACCATTATA	AATCGGTACC	TTTACTTTCC	ACCAAAGAG
	2410	2420	2430	2440	2450	2460
	GTATGAAAC	GGTTGTTAAA	CTTGATTATG	CTACGTTCCG	CTTTGAGCAA	GGTTCAATTT
	CATACITTTG	CCAACAATTT	GAACATAATC	GATGCAAGCG	GAAACTCGTT	CCAAGTTAAA
15	2470	2480	2490	2500	2510	2520
	CTATTCCCAA	AATCGAAGAT	GCGCTTGCTC	AGTGTGATTT	ACATTTTGCA	CAGATATCTA
	GATAAGGGTT	TTAGCTTCTA	CGCGAACGAG	TCACACTAAA	TGTAAAACGT	GTCTATAGAT
	2530	2540	2550	2560	2570	2580
	ACGCAAGTGA	GAATTCCCCC	TACAATTCCC	CTGCGGGACT	CTTCTTTAAG	CCTAACAACG
	TGCGTTCACT	CTTAAGGGGG	ATGTTAAGGG	GACGCCCTGA	GAAGAAATTC	GGATTGTTGC
	2590	2600	2610	2620	2630	2640
20	GCGCGAACA	GTCTCCGCAC	TCCTTACAAG	TGTCTGGTCA	TGGTTGTGAG	CTTTTCCGCT
	CGCGCTTTGT	CAGAGGCGTG	AGAAATGTTT	ACAGACCAGT	ACCAACACTC	GAAAAGGCGA
	2650	2660	2670	2680	2690	2700
	CTACCTTGCC	TCCGCTCGCG	TCCTTGATGC	AGGAAGGTCA	CGAATTCGGT	CACTTTTCTC
	GATGGAACGG	AGCCGAGCGC	AGGAAGTACG	TCCTTCCAGT	GCTTAAGCCA	GTGAAAAGAG
	2710	2720	2730	2740	2750	2760
	GTCTTGACTT	TTGCTTTGAT	GTTGTTATGA	CAAAACTACG	GTGGCGTGAG	TTTTATTTGG
	CAGAACTGAA	AACGAACTA	CAACAATACT	GTTTTGATGC	CACCGCACTC	AAAATAAACC
25	2770	2780	2790	2800	2810	2820
	GTGTTATCTC	TGCTTCCGTC	GATGAGATGA	ATAATCCCGA	AAAAGCCCGT	AAGGTTCCGA
	CACAATAGAG	ACGAAGGCAG	CTACTCTACT	TATTAGGGCT	TTTTCGGGCA	TTCCAAGCGT
	2830	2840	2850	2860	2870	2880
	AATTCATGTA	TCAGGGCTAT	GGTGATTCCA	CTACCGTTTA	TATCGGTCCG	AGAAAGTCTT
	TTAAGTACAT	AGTCCCGATA	CCACTAAGGT	GATGGCAAAT	ATAGCCAGCG	TCTTTTCAGAA
	2890	2900	2910	2920	2930	2940
30	CTGCTGTCTT	CTGCCGTATT	TATAATAAGT	CTCTGCAAGA	CCCTGAAAAA	AAGCTCTGTG
	GACGACAGAA	GACGGCATAA	ATATTATTCA	GAGACGTTCT	GGGACTTTTT	TTGAGAGCAC
	2950	2960	2970	2980	2990	3000
	CGGCTTCTGG	TGAGCTTCTG	GACTGCCCTG	ATGATTCTTA	TATTATTCTG	TATGAGATGG
	GCCGAAGACC	ACTCGAAGAC	CTGACGGGAC	TACTAAGAAT	ATAATAAGCA	ATACTCTACC
	3010	3020	3030	3040	3050	3060
	AGTTAAATTT	TACTTCTCGT	GTGAATTTCT	TTGGCCGTAC	CGTTTATGAC	CCCTCTCCCC
	TCATTTTAA	ATGAAGAGCA	CCTTTAAGAA	AACCGGCTTG	GCAAATACTG	GGGAGAGGGG
35	3070	3080	3090	3100	3110	3120
	TCCTTTCCGA	GTATTACGAA	GACCTGTATA	AGCTCTTCCC	CTATCTCCGT	AAAGTCTCGA
	AGAAACCGT	CATAATCCTT	CTGGGACTAT	TCGAGAAGCG	GATAGAGGCA	TTTCAGACCT

4/13

1 3130 3140 3150 3160 3170 3180
ATCGTTACGG AAATGATACT CTTCTCCCTG ACGGCTGGGA AGATATGCAG TTCGTTACTG
TAGCAATGCC TTTACTATGA GAAGAGGGAC TGCCGACCOCT TCTATACGTC AAGCAATGAC
3190 3200 3210 3220 3230 3240
ATATCGAAGC TCGCAACATT CAGTTTACTA AGGGTTTATT TCGTCCCCCTT AGTAATGACC
5 TATAGCTTCG AGCGTTGTAA GTCAAATGAT TCCCAAATAA AGCAGGGGAA TCATTACTGG
3250 3260 3270 3280 3290 3300
TTGCTCAAAA GTTTTCIGTT TCTATCCATA CTGAAGAACA AAAAATGTCT TATGTTGCTA
AACGAGTTTT CAAAAGACAA AGATAGGTAT GACTTCTTGT TTTTACAGA ATACAACGAT
3310 3320 3330 3340 3350 3360
ATACCITTGG TCATOGTATC ATTGATATTT TGCTTTTATCG TCCTGAGCTG CTTTTCCTCG
TATGGAAACC AGTAGCATAG TAACTATAAA ACGAAATAGC AGGACTCGAC GAAAAGGAGC
3370 3380 3390 3400 3410 3420
10 CTTGTTGCAA GTGGGAGCAG TTTTATAATG AGTGTCCTCC GTTCTCTCCT CTGGCGCTGA
GAACAACGTT CACCCCTCGTC AAAATATTAC TCACAGAAGG CAAGAGAGGA GACCGCGACT
3430 3440 3450 3460 3470 3480
CTCAAGTAGT CGCTCAGTTC TCTGAGTCTT CCCGCATTGC CGTTGAGGAA TTCCGTGAAG
GAGTTCATCA GCGAGTCAAG AGACTCAGAA GGGCGTAAAC GCAACTCCTT AAGGCACCTC
3490 3500 3510 3520 3520 3540
TTGCTGATGA CCCCTCTCCC TTTAGTGAAG ATGGGTTTGA TGATATATCT TTATTCTGAT
15 AACGACTACT GGGGAGAGGG AAATCACTTC TACCCAACT ACTATATAGA AATAAGACTA
3550 3560 3570 3580 3590 3600
GAAAGGATTG TTGCTTTGTG AAAGTTACTG TAGTTGGTAA GTCCACCCGC GCTGGTACAT
CTTTCCTAAC AACGAAACAC TTTCATGAC ATCAACCATT CAGGGTGGCG CGACCATGTA
3610 3620 3630 3640 3650 3660
CTAAGCAGGG CAAAGACTAT GATTTTTCTA CTCTCATGGC CGAATATTCT ATGCGTGCAA
GATTCGTCCC GTTTCIGATA CTAAAAGAT GAGAGTACCG GCTTATAAGC TACGCACGTT
3670 3680 3690 3700 3710 3720
20 ATGATGACAA TGATGGCGTG CAGGTTGATA GAATCAATGT TGACGCTCCG ATGATGCCGT
TACTACTGTT ACTACCGCAC GTCCAACAT CTTAGTTACA ACTGCGAGCG TACTACGGCA
3730 3740 3750 3760 3770 3780
ATGCGCTCAT TGTGTTTGGC GCTACGTATG ACCTTGACTT TGACCGTAAC GGATATCTTC
TACGCGAGTA ACAGCAACCG CGATGCATAC TGGAACGTAA ACTGGCATTG CCTATAGAAG
3790 3800 3810 3820 3830 3840
TCGGAATTGA GGAAGTCTAA CTCCCTTTGT TCAAACCTAA ATTTCAATTTC CTATGGGAGA
25 AGCCTTAACT CCTTCAGATT GAGGGAAACA AGTTTGGATT TAAAGTAAAG GATACCCCTCT
3850 3860 3870 3880 3890 3900
GCGGTTCCGC GCTCTCACAT GGCGGGGTAG TGCAATGGTC GCATGTCACT CTCTGAAGGT
CGCCAAGCGG CGAGAGTGTA CCGCCCCATC ACGTTACCAG CGTACAGTGA GAGACTTCCA
3910 3920 3930 3940 3950 3960
GAAGCTGCTG GTTCGAATCC AGACCCCGCA ACCAAAACCG ATTTGACCTC CGTTATTCTGA
CTTCGACGAC CAAGCTTAGG TCTGGGGCGT TGGTTTGTCC TAAACTGGAG GCAATAAGCT
3970 3980 3990 4000 4010 4020
30 TGTCCGGAAA GGTGGTGGCG AAGTGATGAA AAAGCATCGG TGTMTTATA AGCGTTTCCG
ACAGCGCTTT CCACCACCGC TTCACTACTT TTTCGTAGCC ACAAAAATAT TCGCAAAGCG
4030 4040 4050 4060 4070 4080
CGCCCTTCTC GCGTCTTTGA TCGTTCTTTT TTCCTTGTGT ACTCCTTGTT TTGCTCGATT
GCGGGAAGAG CGCAGAACT ACCAAGAA AAGGAACACA TGAGGAACAA AACGACCTAA
4090 4100 4110 4120 4130 4140
TGACTCTGAA GCTGATATGC CMTCTTTGGA TGATTTCTAT ACTCATCTG GTTCATGGTT
ACTGAGACTT CGACTATACG GTAGAAACCT ACTAAGATA TGAGTAGTAC CAAGTACCAA
35 4150 4160 4170 4180 4190 4200
TGTTTCGGGT AGTGCTACTA TTTCTGGCTT TCCTTTTAT GAGTTGCTTT GCTCTCCTAT
ACAAACCGCA TCACGATCAT AAAGACCGAA AGGAAATA CTCACCAA CAGAGGATA

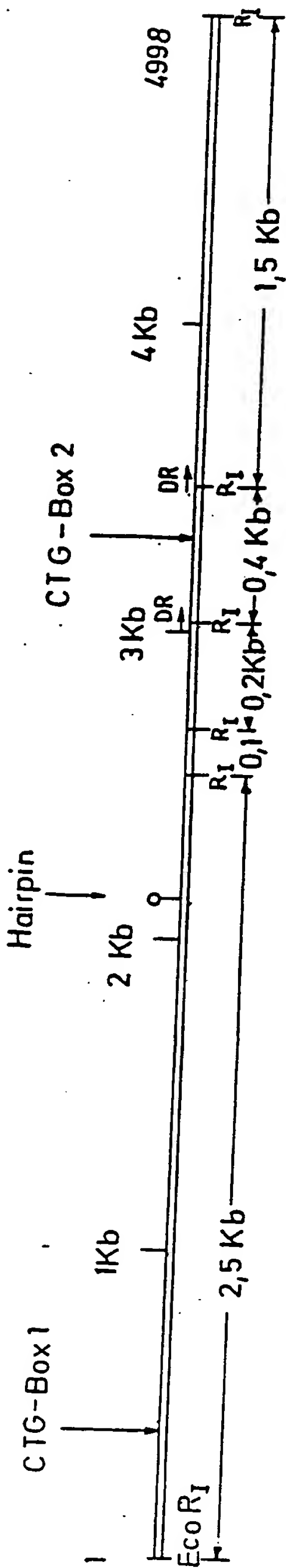
5/13

1 4210 4220 4230 4240 4250 4260
TACTGTTTCT GGCACACTCTT ATTCTCTGCG TTATTTCGGT TCTTATTCTA CTAATGCGTT
ATGACAAAGA CCGTGATGAA TAAGAGACGG AATAAGCCAA AGAATAAGAT GATTACGCCAA
4270 4280 4290 4300 4310 4320
TGATGTTTCT TATTTAGCTA ACGATTCTGG CAAATCTTAT GATTATGCTT GCGCTTTTCC
5 ACTACAAAGA ATAAATCGAT TGCTAAGACC GTTTAGAATA CTAATACGAA CGCGAAAAGG
4330 4340 4350 4360 4370 4380
TCTTCCTCTT CGTGGTGCTT CTGGTTATTG GTATGAACCT CCTTCCTTCC CTATTGGTTC
AGAAGGAGAA GCACCACGAA GACCAATAAC CATACTTGAT GGAAGAAAGG GATAACCAAG
4390 4400 4410 4420 4430 4440
GGGAATGAAG TTGATACGT GCTCTGTTCC CGTTTATTCT ACCGCTGCTC AACCTTCTGG
CCCCTACTTC AAACATATGCA CGAGACAAGC GCAAATAAGA TGGCGACGAG TTGGAAGACC
4450 4460 4470 4480 4490 4500
10 GACTTATGGT TTTTAACTT CTTCCTTCTAG TCGCTCAGAC CGCATTCCTT CTTTCGGTAA
CTGAATACCA AAAAATTGAA GAAGGAAATC AGCGAGTCTG GCGTAAGAAA GAAAGCCATT
4510 4520 4530 4540 4550 4560
CACTGCCCTCT TCTTCTCTCG GTTCTTCTAC TGATACITTA GATTCTTTTA GTTTTCTCTC
GTGACGGAGA AGAAGAAGAC CAAGAAGATG ACTATGAAAT CTAAGAAAAT CAAAAAGAAG
4570 4580 4590 4600 4610 4620
TCCITTTTAT TCGTATCCTT TTGCAATTCT TTCTACTTCT TCTTCTTCCG CAAGTGGTTA
15 AGGAAAAATA AGCATAGGAA AACGTTAAGC AAGATGAAGA AGAAGAAGGC GTTCACCAAT
4630 4640 4650 4660 4670 4680
TGTTTACAG GGTGGTGACA ATAATTTTAT TATTCCTTCT CCTGGCTATT CGAGTACCCG
ACAAAATGTC CCACCACGT TATTAAAATA ATAAGGAAGC GGACCGATAA GCTCATGGGC
4690 4700 4710 4720 4730 4740
TGCTTTGAAT CTTGGTGTTA CTCGTTATCT TCGGGAACT AATGCTTTTG TCCCTTATCC
ACGAAACTTA GAACCACAAT GAGCAATAGA AGCGCCCTGA TTACGAAAAC AGGGAATAGG
4750 4760 4770 4780 4790 4800
20 GTCGGATAC ACTATCCCTT CTCTGATAT CGGTTTTGTT TTTGTTTCAGC AGCCATCTTC
CAGACCTATG TGATAGGGGA GAAGACTATA GCCAAAACAA AAACAAGTCG TCGGTAGAAG
4810 4820 4830 4840 4850 4860
TTCTCCTGTT TATTCTGCTT CTGCCCTTGA TACTACAGGT TCTTTTCGCTT TTTCTCTTCT
AAGAGGCAA ATAAGACGAA GACGGAAACT ATGATGTCCA AGAAAGCGAA AAAGAGAAGA
4870 4880 4890 4900 4910 4920
25 TGTTCCCTGCT TCTCGTCTCC CTGACGTTAA GCTTGGTGAC TGGCTGTCCG ATTCTCCGGA
ACAAGGACGA AGAGCAGAGG GACTGCAATT CGAACCCTG ACCGACAGGC TAAGAGCCCT
4930 4940 4950 4960 4970 4980
GGATTGCAA GATGCTATTA CCAATGAATT TGGAGTTGAT TCCGGTACTC TTAAGACTC
CCTAAACGTT CTACGATAAT GGTACTTAA ACCTCAACTA AGGCCATGAG AATTTCTGAG
4990
TAAGGATAAC TTGAATTC 3'
ATTCCTATTG AACTTAAG 5'

30

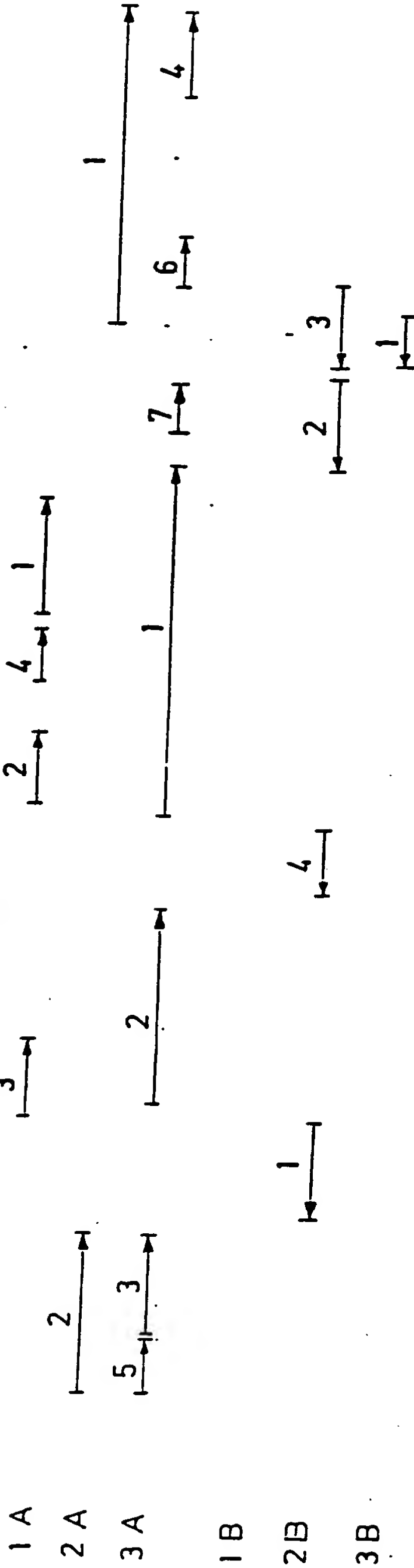
35

ERSATZBLATT



Offene Leserahmen

Leseraster



7/13

35

OPTIONS:

PLUS STRAND
ALL

START AVG ♦ NOT OPENFRAME
ONE LETTER CODE

[illegible]

8/13

SEQUENCE ID: N8 - pUC19

OPTIONS:
 MINUS STRAND
 ALL
 START ATG Ø NOT OPENFRAME
 ONE LETTER CODE

301 CTCACGGCAATGGGGAAGACTCAGAGAACTGACGACTACTTGAGTCAGCGCCAGAGAGAACGGA
 L N G N G G R L R E L S D Y L S Q R Q R R E R K
 S T A (M) G E D S E N * A T T * V S A R G E N G
 Q R Q W G K T Q R T E R L L E S A P E E R T E

231 AGACACTCATTATAAAGCTGCTCCACTTGCAAGCGAGGAAAGCAGCTCAGGACGATAAGCAAA
 T L I I K L L P L A T S E E K Q L R T I K Q N
 R H S L * N C S H L Q Q A R K S S G R * S K I
 D T H Y K T A P T C N K R G K A A Q D D K A K

161 TATCAATGATACGATGACCAAGGTATTAGCAACATAAGACATTTTGTCTTCAGTATGATAGAAC
 I N D T M T K G I S N I R H F L F S (M) D R N
 S (M) I R * P K V L A T * D I F C S S V W I E T
 Y Q * Y D D Q R Y * Q H K T F F V L Q Y G * K Q

91 AGAAACCTTTGAGCAAGGTACTTAAGGGGAGCAATAAACCTTAGTAACTGAATGTGAGCTT
 R K L L S K V I T K G S K * T L V N * (M) L R A S
 E N F * A R S L L R G A N K P * * T E C C E L
 K T F E Q G H Y * G E Q I N L S K L N V A S F

21 CGATATCAGTAACGAACICCA
 I S V T N C
 R Y Q * R T A
 D I S N E L

9/13

6/5.1

1 *** INITIATION/TERMINATION REFERENCE ***

INITIATION POSITION						TERMINATION POSITION						
***** FRAME 1 *****												
5	157	311	433	1060	1309	1435	19	25	139	151	286	481
	1483	1669	1729	2059	2377	2383	487	517	526	556	601	613
	2428	2479	2620	2719	2782	2839	667	676	721	742	745	778
	2971	2992	3046	3133	3235	3292	787	796	799	853	883	898
	3388	3487	3511	3520	3619	3661	1030	1171	1183	1195	1276	1339
	3664	3670	3673	3697	3721	3748	1408	1675	1735	1819	1825	2035
	3859	3883	4135				2044	2053	2125	2278	2287	2365
10							2404	2665	2728	2788	3004	3022
							3418	3427	3559	3571	3712	3868
							4009	4081	4087	4093	4111	4150
							4180	4252	4261	4279	4300	4354
							4393	4468	4498	4531	4549	4636
							4642	4720	4765	4828	4882	4888
							4897	4945	4957	4972	4981	4987
15	TOTAL : 39						TOTAL : 84					
***** FRAME 2 *****												
	131	539	593	815	1052	1202	158	266	440	443	1058	1259
	1205	3539	3833	3875	3986	4040	1301	1310	1433	1529	1574	1613
	4097	4385					1616	1631	1634	1649	1670	1709
20							1727	1730	1751	1757	1763	1778
							1853	1856	1868	1877	1982	2009
							2060	2258	2372	2384	2417	2423
							2444	2495	2519	2528	2567	2573
							2627	2705	2717	2747	2783	2792
							2810	2843	2903	2906	2924	2951
							2969	2972	2993	3047	3086	3089
							3110	3134	3149	3179	3209	3230
25							3233	3236	3272	3299	3323	3344
							3386	3389	3443	3464	3476	3485
							3488	3503	3506	3518	3521	3578
							3602	3620	3662	3665	3671	3686
							3689	3701	3749	3755	3761	3767
							3788	3818	3944			
30	TOTAL : 14						TOTAL : 99					
***** FRAME 3 *****												
	27	282	483	522	555	693	75	168	189	253	447	540
	741	744	774	930	1194	1275	732	1053	1203	1206	1401	1458
	1287	1476	1599	1656	1770	1800	2097	2133	2193	2313	2331	2343
	1845	1947	2292	2403	2667	2727	3537	3540	3798	3894	3900	3984
	2787	2826	2997	3165	3285	3636	3987	4038	4275	4386	4455	4539
	3651	3711	3714	3960	4110	4123	4686	4992				
	4179	4254	4263	4299	4305	4353						
35	4446	4620	4722	4932	4944							
	TOTAL : 47						TOTAL : 32					

10/13

*** MOLECULAR WEIGHT ***

6/5.2

1	START	END	MOLECULAR WEIGHT	NO.	START	END	MOLECULAR WEIGHT
	***** FRAME 1 *****						
5	157	286	4842.59	1	3046	3418	13607.00
	331	481	5857.77	2	3133	3418	10646.71
	433	481	1911.04	3	2428	2665	9020.45
	1060	1171	4219.95	4	1435	1675	8907.70
	1309	1339	1055.14	5	2479	2665	7032.09
	1435	1675	8907.70	6	1483	1675	6959.42
	1483	1675	6959.42	7	3235	3418	6919.29
	1669	1675	262.36	8	2839	3004	6213.38
10	1729	1735	305.39	9	331	481	5857.77
	2059	2125	2514.97	10	3721	3868	5519.15
	2377	2404	1011.23	11	157	286	4842.59
	2383	2404	750.93	12	3883	4009	4697.94
	2428	2665	9020.45	13	3292	3418	4696.55
	2479	2665	7032.09	14	3748	3868	4490.94
	2620	2665	1563.81	15	1060	1171	4219.95
	2719	2728	375.51	16	3619	3712	3648.43
15	2782	2788	305.39	17	3487	3559	2767.29
	2839	3004	6213.38	18	2059	2125	2514.97
	2971	3004	1408.75	19	3661	3712	1946.41
	2992	3004	578.66	20	433	481	1911.04
	3046	3418	13607.00	21	3511	3559	1887.18
	3133	3418	10646.71	22	3664	3712	1815.22
	3235	3418	6919.29	23	3520	3559	1585.79
20	3292	3418	4696.55	24	3670	3712	1582.93
	3388	3418	1294.51	25	2620	2665	1563.81
	3487	3559	2767.29	26	3673	3712	1451.74
	3511	3559	1887.18	27	2971	3004	1408.75
	3520	3559	1585.79	28	3388	3418	1294.51
	3619	3712	3648.43	29	1309	1339	1055.14
	3661	3712	1946.41	30	2377	2404	1011.23
25	3664	3712	1815.22	31	2383	2404	750.93
	3670	3712	1582.93	32	2992	3004	578.66
	3673	3712	1451.74	33	3697	3712	547.68
	3697	3712	547.68	34	4135	4150	535.70
	3721	3868	5519.15	35	2719	2728	375.51
	3748	3868	4490.94	36	1729	1735	305.39
	3859	3868	277.33	37	2782	2788	305.39
	3883	4009	4697.94	38	3859	3868	277.33
30	4135	4150	535.70	39	1669	1675	262.36
	***** FRAME 2 *****						
	131	158	1002.19	1	539	1058	19095.03
	539	1058	19095.03	2	593	1058	17110.92
	593	1058	17110.92	3	815	1058	9231.94
	815	1058	9231.94	4	3832	3944	4193.88
	1052	1058	236.23	5	3875	3944	2659.22
35	1202	1259	2324.59	6	1202	1259	2324.59
	1205	1259	2193.40	7	1205	1259	2193.40
	3537	3576	1532.73	8	3537	3576	1532.73
	3822	3944	4193.88	9	131	158	1002.19
	3875	3944	2659.22	10	1052	1058	236.23

ERSATZBLATT

11/13

6/5.3

1	27	75	*****	FRAME	3	*****	
	282	447	1815.23		1	2403	3537
	483	540	5855.63		2	2667	3537
	522	540	2003.43		3	2727	3537
5	555	732	616.78		4	2787	3537
	693	732	7063.49		5	2826	3537
	741	1053	1636.98		6	1476	2097
	744	1053	11799.97		7	2997	3537
	774	1053	11668.78		8	1599	2097
	930	1053	10510.39		9	1656	2097
	1194	1203	4670.61		10	3165	3537
10	1275	1401	334.43		11	1770	2097
	1287	1401	4929.75		12	741	1053
	1476	2097	4398.11		13	744	1053
	1599	2097	24121.86		14	1800	2097
	1656	2097	19440.48		15	774	1053
	1770	2097	17213.04		16	4722	4992
	1800	2097	12848.35		17	1845	2097
	1845	2097	11612.94		18	3285	3537
15	1947	2097	9839.93		19	555	732
	2292	2313	5672.19		20	4110	4275
	2403	3537	766.90		21	3636	3798
	2667	3537	43550.02		22	282	447
	2727	3537	34028.78		23	4128	4275
	2787	3537	31646.22		24	1947	2097
	2826	3537	29263.59		25	3651	3798
20	2997	3537	27663.74		26	1275	1401
	3165	3537	21162.74		27	930	1053
	3285	3537	14339.49		28	1287	1401
	3636	3798	9689.43		29	4179	4275
	3651	3798	6115.51		30	4299	4386
	3711	3798	5533.90		31	3711	3798
	3714	3798	3278.61		32	3714	3798
	3960	3984	3147.42		33	4305	4386
25	4110	4275	918.13		34	4620	4686
	4128	4275	6361.00		35	4932	4992
	4179	4275	5690.14		36	483	540
	4254	4275	3784.82		37	4944	4992
	4263	4275	923.20		38	27	75
	4299	4386	522.66		39	693	732
	4305	4386	3385.17		40	4353	4386
30	4353	4386	3140.83		41	4254	4275
	4446	4455	1350.57		42	3960	3984
	4620	4686	395.51		43	2292	2313
	4722	4992	2646.26		44	522	540
	4932	4992	10224.42		45	4263	4275
	4944	4992	2321.86		46	4446	4455
			1867.26		47	1194	1203
							334.43

35

12/13

6/6.1

1. *** INITIATION/TERMINATION REFERENCE ***

INITIATION POSITION						TERMINATION POSITION						
***** FRAME 1 *****												
5	514	1399	3946			187	211	262	292	331	379	
						430	553	568	583	652	694	
						700	727	754	766	778	820	
						871	874	880	991	1111	1180	
						1186	1255	1270	1303	1363	1369	
						1396	1432	1495	1678	1699	1735	
10						1768	1789	1792	1822	1987	2014	
						2146	2173	2233	2272	2356	2425	
						2431	2479	2536	2566	2581	2626	
						2647	2812	2920	2923	2977	2989	
						3016	3052	3076	3202	3229	3235	
						3247	3274	3280	3355	3367	3424	
						3505	3523	3544	3565	3649	3652	
						3700	3718	3730	3760	3769	3778	
15						3805	3808	3922	3928	3940	4042	
						4069	4078	4087	4102	4123	4258	
						4306	4438	4495	4621	4657	4675	
						4684	4816					
TOTAL : 3						TOTAL : 104						
***** FRAME 2 *****												
20	203	863	896	1115	1139	1172	17	26	59	62	110	164
	1685	1730	2378	2495	2621	2642	245	278	299	347	350	404
	3569	3875	4427	4778			449	470	530	578	626	719
							746	749	782	797	800	839
							842	1142	1166	1466	1781	1994
							2261	2393	2498	2543	2837	2945
							3323	3530	3881	3968	3977	3983
25							3986	4034	4049	4052	4082	4157
							4184	4187	4190	4193	4202	4211
							4220	4334	4397	4433	4502	4529
							4532	4535	4538	4742	4859	4862
TOTAL : 16						TOTAL : 66						
***** FRAME 3 *****												
30	870	873	1002	1269	1287	1362	372	459	522	543	639	723
	1542	1677	1800	2172	2646	3114	864	1044	1173	1200	1380	1563
	3153	3639	3675	3699	3816	4716	1575	1614	1662	1686	1707	1752
							1797	1872	1896	1923	1953	2007
							2019	2097	2139	2160	2166	2244
							2307	2319	2379	2457	2508	2571
							2643	2667	2865	3069	3111	3159
							3183	3330	3351	3450	3465	3477
35							3516	3540	3597	3681	3690	3705
							3786	3876	4266	4284	4779	4803
							4821	4923				
TOTAL : 18						TOTAL : 62						

13/13

6/6.2

1 *** MOLECULAR WEIGHT ***

	START	END	MOLECULAR WEIGHT	NO.	START	END	MOLECULAR WEIGHT
***** FRAME 1 *****							
5	514	553	1629.87	1	3946	4042	3550.03
	1399	1432	1344.47	2	514	553	1629.87
	3946	4042	3550.03	3	1399	1432	1344.47
***** FRAME 2 *****							
10	203	245	1707.87	1	3569	3881	11635.17
	863	1142	10853.68	2	1172	1466	11262.47
	896	1142	9431.19	3	863	1142	10853.68
	1115	1142	1115.33	4	896	1142	9431.19
	1139	1142	149.21	5	2621	2837	7747.28
	1172	1466	11262.47	6	2642	2837	6866.30
	1685	1781	3768.36	7	1685	1781	3768.36
	1730	1781	1988.33	8	4778	4859	3218.74
	2378	2393	656.78	9	1730	1781	1988.33
	2495	2498	149.21	10	203	245	1707.87
15	2621	2837	7747.28	11	1115	1142	1115.33
	2642	2837	6866.30	12	2378	2393	656.78
	3569	3881	11635.17	13	3875	3881	277.38
	3875	3881	277.38	14	4427	4433	246.32
	4427	4433	246.32	15	1139	1142	149.21
	4778	4859	3218.74	16	2495	2498	149.21
***** FRAME 3 *****							
20	870	1044	6984.76	1	870	1044	6984.76
	873	1044	6853.57	2	873	1044	6853.57
	1002	1044	1764.94	3	1269	1380	4059.50
	1269	1380	4059.50	4	1287	1380	3436.80
	1287	1380	3436.80	5	2172	2244	2682.96
	1362	1380	748.87	6	4716	4779	2652.92
	1542	1563	879.86	7	1800	1872	2593.86
	1677	1686	418.54	8	3816	3876	2182.40
25	1800	1872	2593.86	9	3114	3159	1826.12
	2172	2244	2682.96	10	1002	1044	1764.94
	2646	2667	838.92	11	3639	3681	1629.97
	3114	3159	1826.12	12	1542	1563	879.86
	3153	3159	248.34	13	2646	2667	838.92
	3639	3681	1629.97	14	1362	1380	748.87
	3675	3681	206.26	15	1677	1686	418.54
30	3699	3705	236.28	16	3153	3159	248.34
	3816	3876	2182.40	17	3699	3705	236.28
	4716	4779	2652.92	18	3675	3681	206.26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP88/00123

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) ⁶ According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC Int.Cl ⁴ : C 12 N 15/00;A 61 K 39/29;C 12 Q 1/68;G 01 N 33/576																							
II. FIELDS SEARCHED <div style="text-align: center; margin-top: 5px;">Minimum Documentation Searched ⁷</div> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="width: 30%; padding: 5px;">Classification System</th> <th style="padding: 5px;">Classification Symbols</th> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">Int.Cl⁴</td> <td style="padding: 5px;">C 12 N;A 61 K</td> </tr> </table> <div style="text-align: center; margin-top: 5px;">Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁸</div>			Classification System	Classification Symbols	Int.Cl ⁴	C 12 N;A 61 K																	
Classification System	Classification Symbols																						
Int.Cl ⁴	C 12 N;A 61 K																						
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ⁹ <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="width: 10%; padding: 5px;">Category ⁹</th> <th style="width: 70%; padding: 5px;">Citation of Document, ¹¹ with Indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²</th> <th style="width: 20%; padding: 5px;">Relevant to Claim No. ¹³</th> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">X</td> <td style="padding: 5px;">WO,A,84/01107 (THE GENERAL HOSPITAL CORP.) 29 March 1984, see the whole document --</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">1-10</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">X</td> <td style="padding: 5px;">EP,A,0124896 (SEELIG) 14 November 1984, see example 7 --</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">7</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">A</td> <td style="padding: 5px;">EP,A,0066296 (EISAI CO.LTD) 08 December 1982 --</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">A</td> <td style="padding: 5px;">WO,A,82/03330 (TREPO) 14 October 1982 --</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">A</td> <td style="padding: 5px;">La Recherche, Vol.14, No.145, June 1983 (Paris FR) A.Zotov: "Les hépatites", pages 874-865 --</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">P,A</td> <td style="padding: 5px;">EP,A,0242300 (INSTITUT PASTEUR) 21 October 1987 -----</td> <td></td> </tr> </table>			Category ⁹	Citation of Document, ¹¹ with Indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³	X	WO,A,84/01107 (THE GENERAL HOSPITAL CORP.) 29 March 1984, see the whole document --	1-10	X	EP,A,0124896 (SEELIG) 14 November 1984, see example 7 --	7	A	EP,A,0066296 (EISAI CO.LTD) 08 December 1982 --		A	WO,A,82/03330 (TREPO) 14 October 1982 --		A	La Recherche, Vol.14, No.145, June 1983 (Paris FR) A.Zotov: "Les hépatites", pages 874-865 --		P,A	EP,A,0242300 (INSTITUT PASTEUR) 21 October 1987 -----	
Category ⁹	Citation of Document, ¹¹ with Indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³																					
X	WO,A,84/01107 (THE GENERAL HOSPITAL CORP.) 29 March 1984, see the whole document --	1-10																					
X	EP,A,0124896 (SEELIG) 14 November 1984, see example 7 --	7																					
A	EP,A,0066296 (EISAI CO.LTD) 08 December 1982 --																						
A	WO,A,82/03330 (TREPO) 14 October 1982 --																						
A	La Recherche, Vol.14, No.145, June 1983 (Paris FR) A.Zotov: "Les hépatites", pages 874-865 --																						
P,A	EP,A,0242300 (INSTITUT PASTEUR) 21 October 1987 -----																						
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>¹⁰ Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&" document member of the same patent family</p> </div> </div>																							
IV. CERTIFICATION <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%; padding: 5px;"> Date of the Actual Completion of the International Search 29 April 1988 (29.04.88) </td> <td style="width: 50%; padding: 5px;"> Date of Mailing of this International Search Report 01 June 1988 (01.06.88) </td> </tr> <tr> <td style="width: 50%; padding: 5px;"> International Searching Authority European Patent Office </td> <td style="width: 50%; padding: 5px;"> Signature of Authorized Officer </td> </tr> </table>			Date of the Actual Completion of the International Search 29 April 1988 (29.04.88)	Date of Mailing of this International Search Report 01 June 1988 (01.06.88)	International Searching Authority European Patent Office	Signature of Authorized Officer																	
Date of the Actual Completion of the International Search 29 April 1988 (29.04.88)	Date of Mailing of this International Search Report 01 June 1988 (01.06.88)																						
International Searching Authority European Patent Office	Signature of Authorized Officer																						

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

EP 8800123
SA 20814

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 24/05/88. The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A- 8401107	29-03-84	EP-A- 0119259 CA-A- 1189878	26-09-84 02-07-85
EP-A- 0124896	14-11-84	WO-A- 8404326 DE-A- 3316464 AU-A- 2865084 JP-T- 60501241	08-11-84 08-11-84 19-11-84 08-08-85
EP-A- 0066296	08-12-82	JP-A- 57198867 CA-A- 1184846	06-12-82 02-04-85
WO-A- 8203330	14-10-82	FR-A, B 2502154 EP-A, B 0074986	24-09-82 30-03-83
EP-A- 0242300	21-10-87	FR-A- 2597606 JP-A- 62249999	23-10-87 30-10-87

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP 88/00123

I. KLASSIFIKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben) ⁶ Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC Int. Cl. 4 C 12 N 15/00; A 61 K 39/29; C 12 Q 1/68; G 01 N 33/576																							
II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE <div style="text-align: right; margin-right: 50px;">Recherchierter Mindestprüfstoff⁷</div> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 30%; padding: 5px;">Klassifikationssystem</td> <td style="padding: 5px;">Klassifikationssymbole</td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">Int. Cl. 4</td> <td style="padding: 5px;">C 12 N; A 61 K</td> </tr> </table> <div style="text-align: center; margin-top: 5px;"> Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen⁸ </div>			Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole	Int. Cl. 4	C 12 N; A 61 K																	
Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole																						
Int. Cl. 4	C 12 N; A 61 K																						
III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN⁹ <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%; padding: 5px;">Art*</th> <th style="width: 70%; padding: 5px;">Kennzeichnung der Veröffentlichung¹¹, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile¹²</th> <th style="width: 20%; padding: 5px;">Betr. Anspruch Nr. ¹³</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center; padding: 5px;">X</td> <td style="padding: 5px;">WO, A, 84/01107 (THE GENERAL HOSPITAL CORP.) 29. März 1984, siehe das ganze Dokument --</td> <td style="text-align: center; padding: 5px;">1-10</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 5px;">X</td> <td style="padding: 5px;">EP, A, 0124896 (SEELIG) 14. November 1984, siehe Beispiel 7 --</td> <td style="text-align: center; padding: 5px;">7</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 5px;">A</td> <td style="padding: 5px;">EP, A, 0066296 (EISAI CO. LTD) 8. Dezember 1982 --</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 5px;">A</td> <td style="padding: 5px;">WO, A, 82/03330 (TREPO) 14. Oktober 1982 --</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 5px;">A</td> <td style="padding: 5px;">La Recherche, Band 14, Nr. 145, Juni 1983 (Paris, FR), A. Zotov: "Les hépatites", Seiten 874-865 --</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 5px;">P, A</td> <td style="padding: 5px;">EP, A, 0242300 (INSTITUT PASTEUR) 21. Oktober 1987 -----</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>			Art*	Kennzeichnung der Veröffentlichung ¹¹ , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile ¹²	Betr. Anspruch Nr. ¹³	X	WO, A, 84/01107 (THE GENERAL HOSPITAL CORP.) 29. März 1984, siehe das ganze Dokument --	1-10	X	EP, A, 0124896 (SEELIG) 14. November 1984, siehe Beispiel 7 --	7	A	EP, A, 0066296 (EISAI CO. LTD) 8. Dezember 1982 --		A	WO, A, 82/03330 (TREPO) 14. Oktober 1982 --		A	La Recherche, Band 14, Nr. 145, Juni 1983 (Paris, FR), A. Zotov: "Les hépatites", Seiten 874-865 --		P, A	EP, A, 0242300 (INSTITUT PASTEUR) 21. Oktober 1987 -----	
Art*	Kennzeichnung der Veröffentlichung ¹¹ , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile ¹²	Betr. Anspruch Nr. ¹³																					
X	WO, A, 84/01107 (THE GENERAL HOSPITAL CORP.) 29. März 1984, siehe das ganze Dokument --	1-10																					
X	EP, A, 0124896 (SEELIG) 14. November 1984, siehe Beispiel 7 --	7																					
A	EP, A, 0066296 (EISAI CO. LTD) 8. Dezember 1982 --																						
A	WO, A, 82/03330 (TREPO) 14. Oktober 1982 --																						
A	La Recherche, Band 14, Nr. 145, Juni 1983 (Paris, FR), A. Zotov: "Les hépatites", Seiten 874-865 --																						
P, A	EP, A, 0242300 (INSTITUT PASTEUR) 21. Oktober 1987 -----																						
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen¹⁰:</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p> </div> </div>																							
IV. BESCHEINIGUNG <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%; padding: 5px;"> Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 29. April 1988 </td> <td style="width: 50%; padding: 5px;"> Absendedatum des internationalen Recherchenberichts 01.06.88 </td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;"> Internationale Recherchenbehörde Europäisches Patentamt </td> <td style="padding: 5px;"> Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten P.C.G. VAN DER PUTTEN </td> </tr> </table>			Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 29. April 1988	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts 01.06.88	Internationale Recherchenbehörde Europäisches Patentamt	Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten P.C.G. VAN DER PUTTEN																	
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 29. April 1988	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts 01.06.88																						
Internationale Recherchenbehörde Europäisches Patentamt	Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten P.C.G. VAN DER PUTTEN																						

**ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT
ÜBER DIE INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR.**

EP 8800123
SA 20814

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.
Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am 24/05/88.
Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO-A- 8401107	29-03-84	EP-A- 0119259 CA-A- 1189878	26-09-84 02-07-85
EP-A- 0124896	14-11-84	WO-A- 8404326 DE-A- 3316464 AU-A- 2865084 JP-T- 60501241	08-11-84 08-11-84 19-11-84 08-08-85
EP-A- 0066296	08-12-82	JP-A- 57198867 CA-A- 1184846	06-12-82 02-04-85
WO-A- 8203330	14-10-82	FR-A,B 2502154 EP-A,B 0074986	24-09-82 30-03-83
EP-A- 0242300	21-10-87	FR-A- 2597606 JP-A- 62249999	23-10-87 30-10-87